Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 343- 365

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۶۵-۳۴۳

Homepage: http://ifstrj.um.ac.ir

Full Research Paper

Investigation of the synergistic and antagonistic properties of *Spirulina platensis* and *Moringa oleifera* extracts on virgin olive oil

Sanaz Fallah-Taftizadeh[1], Gholamreza Abdi[2], Fatemeh Zendeboodi[3*], Mahdi Mohammadi[2]

Received: 2020.10.05
Accepted: 2020.12.28

How to cite this article:
Fallah-Taftizadeh, S., Abdi, Gh. R., Zendeboodi, F., Mohammadi, M. (2022). Investigation of the synergistic and antagonistic properties of *Spirulina platensis* and *Moringa oleifera* extracts on virgin olive oil. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*. *18* (2), 343-365.

Abstract

Introduction: Virgin olive oil has high oxidative stability due to its special compounds, including large amounts of monounsaturated fatty acids (MUFAs) and a wide range of natural antioxidants. However, virgin olive oil is easily oxidized due to the presence of polyunsaturated fatty acids (PUFAs), mainly linoleic and linolenic acids. Lipid oxidation is the main cause of poor food quality; for this reason, the use of antioxidants is essential to prevent the onset and progression of oxidative damage and increase the shelf life of oils and fats. Because lipid oxidation occurs following a complex set of processes and no antioxidant alone can stop all the oxidation steps and keep oxygen away, a mixture of antioxidants can be used to create a synergistic effect. *Spirulina* is a dry biomass of *Artrhrospira platensis* cyanobacteria. Flavonoids, β-carotene, vitamin A and α- -tocopherol in *spirulina* are largely involved in the high antioxidant activity of this microalgae. The *Moringa oleifera* plant belongs to the *Moringaceae* family, the genus *Moringa* and the species *Oleifera*. This plant is considered as a high-potency natural antioxidant because it is rich in tocopherols, carotenoids, vitamin C, flavonoids and phenolic compounds. Therefore, the aim of this study was to investigate the synergistic and symbiotic effect of *spirulina* and *M. oleifera* extracts as natural antioxidants to increase the oxidation stability and shelf life of virgin olive oil.

Materials and Methods: To prepare the extracts of *s. platensis* and *M. oleifera* plant, both plants were dried in the shade at 30°C for 24 hours in the presence of air, then ground into a powder. Then, 5 g of *s. platensis* and *M. oleifera* powders were extracted with two solvent of ethanol (96%) and methanol. Antioxidant activity was evaluated by measuring the effect of free radical scavenging of ethanolic extracts of Algae Spirulina and Acacia on the synthetic radical DPPH. Determination of total phenol and flavonoid content of all extracts was performed using Folin-Ciocalteu reagent and aluminum chloride colorimetric method, respectively. Polyphenolic compounds of the extracts were identified by HPLC. Extracts were added separately (1000 ppm each) and in combination (500 ppm each) to 100g of virgin olive oil and a sample containing the synthetic antioxidant TBHQ and a sample of virgin olive oil were considered as control. Peroxide index, refractive index and color evaluation (L*, a*, b*) of virgin olive oil samples were measured. Statistical analysis was performed using SPSS software version 19 and the results were expressed as mean ± standard deviation.

Results and Discussion: Based on the results obtained from ethanolic and methanolic *s. platensis* extracts, the highest amount of total phenol in ethanolic extract was equal to 67.19±4.5 mg GA/g and the highest amount of flavonoids in methanolic extract was equal to 12/1±40/267 mg QU/g. In the study of the content of total phenol and

1. Former M.sc Student, Department of Food Science and Technology, Kherad Institute of Higher Education, Bushehr, Iran.
2. Department of Biotechnology, Persian Gulf Research Institute, Persian Gulf University, Bushehr, 7516913817, Iran.
3. Postdoctoral researcher in food science and industry, National Nutrition Food Technology & Research Institute, Shahid Beheshti University, Tehran, Iran.
(*Corresponding Author Email: fzendeboodi@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.40174.0

flavonoids in ethanolic and methanolic extracts of *M. oleifera* plant, there was the highest levels of total phenols and flavonoids in ethanolic extracts of this plant, respectively, 43.43±0.71 mg GA/g and 23.78±1.57 mg QU/g. The results showed that the active compounds in the extracts of *S. platensis* and *M. oleifera* are polyphenolic compounds of rosmarinic acid, catechin, quercetin, vanillin, hesperidin, hesperetin. Changes in peroxide value from the time of production and addition of the extract for 8 hours at 2 hour intervals were investigated. According to the results, the lowest amount of peroxide value (0.38±0.005 meq O_2/kg) was related to the sample containing *M. oleifera* extract at the third storage time. The highest amount of peroxide value was observed in the control and the sample containing TBHQ in the range of 15 meq O_2/kg. Generally, Changes in peroxide value were reduced significantly in the 3 samples containing the extract compared to the control sample and the sample containing TBHQ ($p<0.05$). The presence of extracts in virgin olive oil reduced the parameters of L*a*b*, but the sample containing *S. platensis* extract was no significant difference from the control sample ($p >0.05$). According to the results of peroxide index of samples containing extracts, it can be stated that by recognizing the antioxidant effects of *S. platensis* and *M. oleifera* extract, they can be used for industrial use and replacement with synthetic antioxidants.

Keywords: Virgin olive oil, *Spirulina platensis*, *Moringa oleifera*, Synergitic, Antagonistic, Antioxidant.

Iranian Food Science and Technology Research Journal
Vol. 18, No. 2, June. July. 2022, p. 343- 365

نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران
جلد ۱۸، شماره ۲، خرداد-تیر ۱۴۰۱ ص.۳۶۵-۳۴۳

مقاله علمی-پژوهشی

بررسی خصوصیات هم‌افزایی و هم‌ستیزی عصاره جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ در روغن زیتون بکر

ساناز فلاح تفتی‌زاده[۱]- غلامرضا عبدی[۲]- فاطمه زنده بودی[۳*]- مهدی محمدی[۴]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۷/۱۴
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۱۰/۰۸

چکیده

اکسیداسیون چربی‌ها باعث تغییر در صفات کیفی روغن‌های گیاهی از جمله روغن زیتون بکر می‌شوند. آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی برای حفظ روغن استفاده شده‌اند. با این‌حال، علاقه به جایگزینی آن‌ها با مواد طبیعی وجود دارد. *جلبک اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Spirulina platensis*) و *گیاه گازرخ* (*Moringa Oleifera*) به دلیل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی آن‌ها شناخته شده‌اند. این مطالعه به‌منظور تعیین پایداری اکسیداسیون روغن زیتون بکر حاوی عصاره جلبک *اسپیرولینا* و گیاه *گازرخ* صورت گرفت. بدین منظور، عصاره اتانولی *اسپیرولینا* و *گازرخ* تهیه گردید. میزان ۱۰۰۰ ppm از هر یک از عصاره‌ها به‌صورت جداگانه و ۱۰۰۰ ppm به‌صورت ترکیب آن‌ها (با نسبت مساوی) به ۱۰۰ گرم روغن زیتون بکر اضافه شد و یک نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ (Tert-Butylhydroquinone) و یک نمونه روغن زیتون بکر به‌عنوان شاهد در نظر گرفته شد. ترکیبات پلی‌فنولیک عصاره‌ها توسط HPLC شناسایی شدند. اندیس پراکسید، ضریب شکست و ارزیابی رنگ (L*، a*، b*) نمونه‌های روغن زیتون بکر اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که ترکیبات مؤثره در عصاره‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه *گازرخ*، ترکیبات پلی‌فنولی رزمارینیک اسید، کاتچین، کوئرستین، وانیلین، هسپریدین، هسپرتین است. شاخص پراکسید روغن زیتون در ۳ تیمار حاوی عصاره‌های طبیعی کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ داشت ($p < ۰/۰۵$). وجود عصاره‌های طبیعی در روغن زیتون بکر باعث کاهش ویژگی‌های رنگی (L*، a*، b*) شد ولی با نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری نداشت ($p > ۰/۰۵$). با توجه به نتایج شاخص پراکسید نمونه‌های حاوی عصاره می‌توان بیان کرد که با شناخت اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه *گازرخ* می‌توان از آن‌ها برای استفاده صنعتی و جایگزینی با آنتی‌اکسیدان-های مصنوعی بهره برد.

واژه‌های کلیدی: روغن زیتون بکر، *اسپیرولینا پلاتنسیس*، گیاه *گازرخ*، هم‌افزایی، هم‌ستیزی، آنتی‌اکسیدان.

مقدمه

روغن‌ها و چربی‌ها تأمین بخش قابل توجه انرژی مورد نیاز بدن، اسیدهای چرب ضروری و ویتامین‌های محلول در چربی را بر عهده دارند. روغن زیتون بکر (VOO[۵])، روغنی است که از استحصال روغن از میوه‌های زیتون سالم با استفاده از روش‌های مکانیکی در دمای پایین تولید می‌شود. بخش اعظم روغن زیتون در مناطق مدیترانه‌ای تولید و مصرف می‌شود، اما روغن زیتون بکر به‌دلیل خواص عالی ارگانولپتیکی و مواد مغذی عالی، در سراسر جهان رواج دارد (Servili et al., 2014). روغن زیتون از بخش‌های قابل صابونی شدن و غیرصابونی تشکیل شده است. بخش صابونی عمدتاً از اسیدهای چرب تشکیل شده است، در حالی که بخش غیرصابونی دارای یک مجموعه پیچیده ناهمگن از ترکیبات جزئی است (Servili et al., 2014). اجزای شیمیایی مختلف در این مجموعه ناهمگن شامل آلفاتیک و تری‌ترپنیک الکل‌ها، استرول‌ها، هیدروکربن‌ها، فنول‌ها، توکوفرول‌ها، استرها، رنگدانه‌ها و ترکیبات فرار هستند (Rallo et al., 2018). ترکیبات فنولیک نقش مهمی در ارزش غذایی و خواص ارگانولپتیکی روغن زیتون بکر دارند و این ترکیبات به ماندگاری محصول کمک

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، مؤسسه آموزش عالی خرد، بوشهر، ایران.
۲- استادیار، گروه زیست فناوری، پژوهشکده خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، ۷۵۱۶، بوشهر، ایران.
۳- پژوهشگر پسادکتری علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و علوم صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران.

(*- نویسنده مسئول: Email: fzendeboodi@gmail.com)
DOI: 10.22067/IFSTRJ.2021.40174.0
5 Virgin Olive Oil

می‌کنند و پایداری اکسیداتیو آن را بهبود می‌بخشد (Piroddi et al., 2017; Silva et al., 2010).

روغن زیتون بکر به دلیل ترکیبات خاص خود از جمله مقادیر زیادی اسیدهای چرب تک غیراشباع (MUFAs[1]) و طیف وسیعی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، از پایداری اکسیداتیو بالایی برخوردار است (Frankel, 2010). با این وجود، روغن زیتون بکر به‌دلیل وجود اسیدهای چرب چند غیراشباع (PUFAs[2])، عمدتاً اسیدهای لینولئیک و لینولنیک، به راحتی اکسید می‌شود (Morales & Przybylski, 2013). اکسیداسیون روغن زیتون بکر منجر به تشکیل ترکیبات مختلفی مانند رادیکال‌های آزاد، هیدروپراکسی‌ها و محصولات اکسیداسیون تخریب شده مضر می‌شود، که با تغییر رنگ، بوی تند و کاهش کیفیت روغن زیتون بکر همراه است (Frankel, 2010). اکسیداسیون لیپیدها، علت اصلی افت کیفیت ماده غذایی است؛ به همین دلیل، استفاده از آنتی‌اکسیدان‌ها برای جلوگیری از آغاز و پیشرفت فساد اکسیداتیو افزایش عمر نگهداری روغن‌ها و چربی‌ها ضروری است (O'brien, 2008).

مطالعات متعددی، تأثیرگذاری آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی مختلف را بر پایداری اکسیداتیو روغن‌های غذایی، بررسی کرده‌اند. آلفا، گاما و دلتاتوکوفرول‌ها در روغن‌های گیاهی وجود دارد و آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی اصلی در روغن‌ها هستند (Hraš et al., 2000). از آنجا که اکسیداسیون لیپیدها به دنبال مجموعه‌ای پیچیده از فرآیندها رخ می‌دهد و هیچ آنتی‌اکسیدانی به تنهایی قادر به جلوگیری از همه مراحل اکسیداسیون و دور نگه داشتن اکسیژن نیست، می‌توان از مخلوط آنتی‌اکسیدان‌ها برای ایجاد یک تأثیر هم‌افزایی (سینرژیستی[3]) استفاده کرد (Hraš et al., 2000).

اسپیرولینا، زیست توده خشک سیانوباکتری *آرتروسپیرا پلاتنسیس* (*Artrhrospira platensis*) می‌باشد (Belay, 2008). *اسپیرولینا* غنی از پروتئین، رنگدانه (شامل کلروفیل، میکسوزانتوفیل، بتا-کاروتن، زی‌زانتین و زانتوفیل)، کربوهیدرات، مقدار نسبتاً بالایی از سیانوکوبالامین (ویتامین B12)، مواد معدنی و سوپراکسید دیسموتاز است. سوپراکسید دیسموتاز مهار کننده رادیکال آزاد است (Cohen, 1997). فلاوونوئید، بتا-کاروتن، ویتامین A و آلفا توکوفرول موجود در اسپیرولینا تا حد زیادی در فعالیت بالای آنتی‌اکسیدانی حاصل از این ریز جلبک شرکت می‌کنند (Wang et al., 2007). گزارش شده که عصاره *اسپیرولینا* به‌عنوان آنتی‌اکسیدانی قابل دسترس و ایمن، می‌تواند جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی باشد (Mendiola et al., 2007).

گیاه *گازرخ* متعلق به خانواده *مورینگاسه* (*Moringaceae*)، جنس *مورینگا* (*Moringa*) و گونه *اولیفرا* (*Oleifera*) است. این گیاه به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی با قدرت بالا محسوب می‌شود زیرا سرشار از توکوفرول‌ها، کاروتنوئیدها، ویتامین C، فلاوونوئیدها و ترکیبات فنولیک است (Iqbal & Bhanger,2008). فلاوونوئیدها با مهار رادیکال‌های اکسیژن با داشتن فعالیت‌های ضدسرطان، ضدپیری و ضدالتهابی، آنتی‌اکسیدان‌های بسیار مؤثری هستند (Braca et al., 2002). مطالعات متعددی در زمینه عصاره جلبک *اسپیرولینا* و گیاه *گازرخ* برروی روغن‌های خوراکی و پایداری اکسیداتیو آن‌ها صورت گرفته است؛ از جمله مطالعه Morsy و همکاران (۲۰۱۹) در تقویت پایداری اکسیداتیو و ویژگی‌های کیفیت روغن زیتون با استفاده از نانوذرات *اسپیرولینا* (*Arthrospira platensis*) است که نتایج آن‌ها تأیید کرد وجود Sp-NPsها در مهار اکسیداسیون، بهبود رنگ روغن و افزایش ماندگاری تا ۴۷۵ روز در ۲۵ درجه سانتی‌گراد مؤثر هستند (Morsy et al., 2019). در مطالعه‌ای دیگر از Rasika (۲۰۱۳) فعالیت ضدمیکروبی *مورینگا اولیفرا* و هم‌افزایی آن با کنجد وحشی (*Cleome viscosa*) مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که ترکیبی از کنجد وحشی و *مورینگا اولیفرا* اثر هم‌افزایی قوی نسبت به *کلبسیلا پنومونیه*، *اشریشیا کلی*، *استرپتوکوک پنومونیه* و *استافیلوکوکوس اورئوس* دارند (Rasika, 2013). از این‌رو، هدف از این پژوهش، بررسی اثر هم‌افزایی و هم‌ستیزی عصاره ریزجلبک *اسپیرولینا* و گیاه *گازرخ* به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی جهت افزایش پایداری اکسیداسیون و زمان ماندگاری روغن زیتون بکر می‌باشد.

مواد و روش‌ها

روغن زیتون فرابکر تجاری از فروشگاه زنجیره‌ای شهرستان شیراز خریداری شد که مشخصات کامل آن در جدول ۱ ارائه شده است. برگ گیاه *گازرخ* و جلبک *اسپیرولینا* از پژوهشکده کشاورزی دانشگاه خلیج فارس بوشهر تهیه گردید و قبل از عصاره‌گیری مورد آنالیز قرار گرفت که نتایج در جدول ۲ گزارش شده ست. آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ[4] (Camlin، هندوستان) استفاده گردید. تیوسولفات سدیم، نشاسته، پتاسیم یدید، استیک‌اسید، کلروفرم (Merck، آلمان) مورد استفاده قرار گرفت.

1 MonoUnsaturated Fatty Acids
2 PolyUnsaturated Fatty Acids
3 synergistic

4 Tert-Butylhydroquinone

تهیه و استخراج عصاره از جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ

سلول‌های کشت داده شده جلبک اسپیرولینا برداشت و سپس شستشو شدند. سپس اسپیرولینای شسته شده در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت در سایه خشک شد، محصول ورقه‌ای *به‌دست* آمده جمع‌آوری شد و با آسیاب، به پودر اسپیرولینا تبدیل شد (Choonawala, 2007). همچنین خشک کردن برگ گیاه گازرخ در سایه و در مجاورت هوا با دمای حدود ۳۰ درجه سلسیوس خشک گردید و سپس به پودر تبدیل شد.

عصاره‌گیری جلبک اسپیرولینا و برگ گیاه گازرخ در مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی فارس انجام گرفت. برای تهیه عصاره، ۵ گرم از پودر جلبک اسپیرولینا و پودر برگ گیاه گازرخ با ۵۰ میلی‌لیتر اتانول غلیظ (۹۶ درصد) هر کدام در یک بشر جداگانه توسط همزن مغناطیسی مخلوط شد و پس از درپوش‌گذاری ظروف با فویل، به مدت ۲۴ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس برای شفاف‌سازی عصاره از سانتریفوژ با دور g. ۹۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس استفاده گردید. لایه رویی عصاره به آرامی برداشته شد، عصاره استخراج شده با کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) صاف گردید. سپس عصاره تهیه شده توسط آون (Memmert، ULM-500، آلمان) در دمای ۴۵ درجه سلسیوس، حلال باقی مانده حذف گردید؛ در انتها پس از حذف حلال بصورت کامل، عصاره‌ها تا انجام آزمایش‌های بعدی در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد (Fayyad et al., 2019).

جدول ۱– مشخصات نمونه روغن زیتون فرابکر قبل از انجام تیمار

Table 1- Specifications of extra virgin olive oil before treatment

Results نتایج	Parameters پارامترها
0	Salt (g) نمک (گرم)
0	Trans fatty acids (g) اسیدهای چرب ترانس (گرم)
9.48	Peroxide (meq O_2/kg) پراکسید (meq O_2/kg)
1.4677	Refractive index ضریب شکست

جدول ۲- نتایج ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی جلبک اسپیرولینا و برگ گیاه گازرخ قبل از عصاره‌گیری

Table 2– Results of physicochemical properties of spirulina algae and leaves of *Moringa oleifera* before extraction

M.oleifera leaf plant powder پودر برگ گیاه گازرخ	Spirulina algae powder پودر جلبک اسپیرولینا	Parameters پارامترها
205	120	Energy (K) انرژی (کالری)
--	10	Sugar (g) قند (گرم)
2.3	0	Fat (g) چربی (گرم)
38.2	27	Carbohydrates (g) کربوهیدرات (گرم)
19.2	1	Fiber (g) فیبر (گرم)
27.1	2	Protein (g) پروتئین (گرم)

آماده‌سازی نمونه روغن زیتون بکر حاوی عصاره گیاهی و شرایط نگهداری آن

پس از تهیه روغن زیتون بکر، جهت انجام این مطالعه طبق جدول ۳ مقادیر مشخص از عصاره جلبک اسپیرولینا و عصاره برگ گیاه گازرخ به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی به ۱۰۰ گرم روغن زیتون بکر اضافه شد. لازم به ذکر است که عصاره‌های اضافه شده به روغن زیتون به راحتی حل شده و این امر می‌تواند به دلیل حلال مورد استفاده (اتانول) در عصاره‌گیری مربوط باشد. جهت مقایسه اثر عصاره‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی، یک نمونه حاوی آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ تهیه شد (جدول ۳). نمونه عاری از عصاره‌های طبیعی و آنتی‌اکسیدان مصنوعی، به‌عنوان تیمار شاهد تعیین شد. بعد از آماده کردن نمونه‌های روغن زیتون بکر، اثر تیمارهای به‌کار رفته بر شدت اکسایش روغن زیتون در شرایط اکسایش تسریع شونده طی نگهداری در دمای ۶۰ درجه سلسیوس به مدت ۸ ساعت و در فواصل زمانی ثابت دو ساعته از طریق سنجش شاخص پراکسید، ضریب شکست و رنگ روغن بررسی گردید (Singh et al., 2006).

جدول ۳- نمونه‌های مورد بررسی در مطالعه

Table 3- The samples studied in the research

Treatment تیمار	Antioxidant content (ppm) میزان آنتی‌اکسیدان (ppm)	Composition of samples ترکیب نمونه‌ها
VOO	-	**Virgin olive oil** **روغن زیتون بکر**
VOO+ S.p	1000	**Virgin olive oil+ spirulina extract** **روغن زیتون بکر+عصاره جلبک اسپیرولینا**
VOO+ M.o	1000	**Virgin olive oil+ M.oleifera extract** **روغن زیتون بکر+عصاره برگ گیاه گازرخ**
VOO+ S.p+ M.o	(500+ 500) 1000	**Virgin olive oil+ spirulina extract+ M.oleifera extract** **روغن زیتون بکر+عصاره جلبک اسپیرولینا+ عصاره برگ گیاه گازرخ**
VOO+ TBHQ	1000	**Virgin olive oil+ TBHQ** **روغن زیتون بکر+TBHQ**

فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها به روش DPPH

فعالیت آنتی‌اکسیدانی با اندازه‌گیری اثر مهار رادیکال آزاد عصاره‌های اتانولی جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ بر رادیکال سنتزی DPPH مورد ارزیابی قرار گرفت. فعالیت آنتی‌اکسیدانی بر طبق روش استفاده شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد (Zhang et al., 2007). آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ به‌عنوان کنترل مثبت استفاده گردید. ۱۰۰ میکرولیتر از هر عصاره در رقت‌های مختلف (۶/۲۵ ppm، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰، ۱۶۰۰ و ۳۲۰۰) را در میکروپلیت ۹۶ خانه ریخته، در خانه‌های جداگانه ۱۰۰ میکرولیتر رقت‌های مختلف TBHQ به‌عنوان کنترل مثبت ریخته شد، سپس به هر یک از آن‌ها ۱۰۰ میکرولیتر محلول متانولی DPPH اضافه شد. آزمایش در محیط تاریک و دور از نور به کمک فویل انجام گردید زیرا محلول DPPH به نور حساس بوده و باعث شکسته شدن ساختار آن می‌گردد. برای هر رقت عصاره یک نمونه شاهد (عصاره بدون محلول DPPH) در نظر گرفته شد. از ۱۰۰ میکرولیتر محلول DPPH و ۱۰۰ میکرولیتر حلال به‌عنوان کنترل منفی استفاده گردید. سپس میکروپلیت ۹۶ تایی را درون میکروپلیت ریدر قرار داده تا ۱۰ ثانیه تکان داده و بعد از ۳۰ دقیقه در تاریکی به حالت سکون گذاشته شد و سپس جذب نمونه‌ها توسط اسپکتروفتومتر UV-Vis در ۵۱۷ نانومتر قرائت شد. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی با استفاده از رابطه ۱ محاسبه گردید:

(۱) $(A_{sample} - A_{sample\ blank}) / A_{control} \times 100$ =درصد مهارکنندگی

A_{sample}: جذب نمونه تست (محلول DPPH+ نمونه تست)

$A_{sample\ blank}$: جذب نمونه (نمونه بدون محلول DPPH)

$A_{control}$: جذب نمونه شاهد (محلول DPPH بدون نمونه)

IC50 یا غلظت مورد نیاز عصاره برای مهار ۵۰ درصد رادیکال DPPH با آنالیز رگرسیون خطی غلظت عصاره در برابر درصد مهار محاسبه گردید.

تعیین مقدار فنول کل عصاره‌ها

تعیین فنول تام عصاره‌ها با استفاده از معرف فولین–سیوکالته و براساس روش Zhang و همکاران (۲۰۰۷) انجام گردید. در این روش مقدار کل ترکیبات فنولی براساس یک ترکیب فنولی انتخاب شده، که در اغلب موارد این ترکیب گالیک‌اسید است، بیان می‌گردد و نتیجه آن

به‌صورت میلی‌گرم گالیک‌اسید بیان می‌شود. جهت انجام آزمون، ۱ میلی‌لیتر عصاره به ۱/۵ میلی‌لیتر آب مقطر دیونیزه اضافه و ۰/۵ میلی‌لیتر معرف فولین- سیوکالته ۰/۱ مولار هم اضافه گردید و محتویات کاملاً مخلوط شدند. پس از ۱ دقیقه، ۱ میلی‌لیتر محلول کربنات‌سدیم ۲۰ درصد اضافه و مخلوط کاملاً همزده شد. نمونه شاهد شامل معرف واکنش بدون نمونه بود. نمونه پس از قرار گرفتن در دمای آزمایشگاه به مدت ۲ ساعت، میزان جذب آن در ۷۵۰ نانومتر قرائت شد و با استفاده از معادله خط منحنی کالیبراسیون گالیک اسید میزان فنول عصاره‌ها براساس معادل میلی‌گرم گالیک اسید در گرم عصاره خشک محاسبه گردید (Zhang et al., 2007).

اندازه‌گیری میزان فلاوونوئید کل عصاره‌ها

مقدار فلاوونوئید کل عصاره‌ها با استفاده از روش رنگ‌سنجی کلریدآلومینیوم براساس روش Chang و همکاران (۲۰۰۲) انجام گرفت. جهت انجام آزمون، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره، ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند. پس از ۳۰ دقیقه قرار گرفتن محلول‌ها در دمای اتاق، میزان جذب واکنش‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002). از کوئرستین برای ایجاد منحنی کالیبراسیون استفاده گردید. بدین جهت مقدار ۱۰ میلی‌گرم کوئرستین در اتانول ۸۰ درصد حل شد و سپس به ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر رقیق شد. سپس محلول‌های استاندارد رقیق شده (۰/۵ میلی‌لیتر) به‌طور جداگانه با ۰/۱ میلی‌لیتر کلریدآلومینیوم ۱۰ درصد، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند و پس از ۳۰ دقیقه جذب آن‌ها در ۴۱۵ نانومتر قرائت گردید. نتایج بر حسب میلی‌گرم کوئرستین بر گرم وزن عصاره بیان گردید. منحنی کالیبراسیون با استفاده از خواندن جذب غلظت‌های مختلف کوئرستین به‌دست آمد (Chang et al., 2002).

ارزیابی ترکیبات عصاره‌ها با HPLC

برای جداسازی و تعیین مقدار فنول‌های موجود در عصاره‌های اسپیرولینا پلاتنسیس و گیاه گازرخ از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) استفاده شد. سیستم مجهز به ستون Zarbax eclipse (XDB) C18 به طول ۱۵۰ میلی‌متر و قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر که با ذراتی به ابعاد ۵ میکرومتر پرشده و دمای ستون ۳۰ درجه سانتی‌گراد بود. دتکتور استفاده شده Diod array detector با طول موج تهییج ۲۸۰ نانومتر و طول موج نشر ۳۲۰ نانومتر، فاز متحرک شامل دو بخش A (متانول) و B (فرمیک اسید ۱ درصد) طبق جدول ۴ و سرعت جریان برابر ۱ میلی‌لیتر در دقیقه و حجم هر بار تزریق نمونه برابر با ۲۰ میکرولیتر بود. داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Chemstation software جمع‌بندی شدند.

جدول ٤- برنامه گرادیانی مورد استفاده در اندازه‌گیری ترکیبات پلی‌فنولیک عصاره‌ها

Table 4- Gradient program used to measure polyphenolic compounds of extracts

Time (min) زمان (دقیقه)	Flow rate (mL.min) سرعت جریان (میلی‌لیتر در دقیقه)	Mobile phase A (methanol) فاز متحرک A (متانول)	Mobile phase B (1% formic acid) فاز متحرک B (فرمیک اسید ۱٪)
Primary time زمان اولیه	1	10	90
10	1	25	75
20	1	60	40
30	1	70	30
40	1	70	30

اندازه‌گیری عدد پراکسید

تعیین عدد پراکسید یکی از متداول‌ترین تست‌هایی است که برای تعیین تندی اکسیداتیو استفاده می‌شود. در این مطالعه اندازه‌گیری عدد پراکسید مطابق با استاندارد ملی ایران به شماره ۴۱۷۹ انجام گرفت. برای بررسی اثر ماندگاری، روغن‌ها به مدت ۸ ساعت در شرایط اکسیداسیون تسریع شده (آون با دمای۶۰ درجه سلسیوس) نگهداری شدند و سپس عدد پراکسید مطابق با روش فوق در نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت. روش کار بدین صورت بود که ۰/۰۵± ۵ گرم نمونه روغن توسط ترازو (دقت ۰/۰۱ گرم، Sartorius، TE412، آلمان) آماده شده در ارلن مایر سر سمباده‌ای ۲۵۰ میلی‌لیتری وزن شده و ۳۰ میلی‌لیتر مخلوط استیک اسید و کلروفرم (نسبت ۳ به ۲) به آن افزوده و سپس ۰/۵ میلی‌لیتر یدید پتاسیم اشباع اضافه گردید. محلول به دست آمده را به مدت ۱ دقیقه بدون هم‌زدن گذاشته، سپس ۳۰ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه کرده و چند قطره چسب نشاسته به آن افزوده که یک رنگ آبی در محلول ایجاد کرد، سپس با تیوسولفات سدیم ۰/۲ نرمال تا از بین رفتن رنگ آبی عیارسنجی ادامه داشت و در آخر عدد پراکسید مطابق رابطه ۲ محاسبه گردید (Iran, 2018):

(۲) $$PV= [(S – B) \times N \times 1000]/ M$$

که در آن:

PV: عدد پراکسید بر حسب میلی اکی‌والان در ۱۰۰۰ گرم نمونه روغن.

S: میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم استفاده شده برای نمونه روغن.

B: میلی‌لیتر تیوسولفات سدیم استفاده شده برای نمونه شاهد.

N: نرمالیته محلول تیوسولفات سدیم.

M: وزن روغن بر حسب گرم.

اندازه‌گیری ضریب شکست

ضریب شکست یک ماده نسبت سرعت نور با طول موج معین در خلاء به سرعت نور در آن ماده است. جهت اندازه‌گیری ضریب شکست روغن از روش استاندارد ملی ایران به شماره ۵۱۰۸ استفاده گردید. قبل از اندازه‌گیری ضریب شکست، قسمت منشور دستگاه رفراکتومتر (Atago، RX5000، ژاپن) با یک پارچه نرم و سپس با یک پنبه مرطوب شده با چند قطره استون تمیز کرده و اجازه داده شد تا خشک شود. سپس بعد از استاندارد کردن دستگاه رفراکتومتر توسط آب مقطر، یک یا دو قطره نمونه روغن برروی منشور دستگاه ریخته و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ضریب شکست نمونه تعیین گردید (Iran, 2011).

ارزیابی رنگ نمونه‌های روغن زیتون بکر (L*,a*,b*)

رنگ به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی و خاصیت در آگاهی از کیفیت محصول شناخته شده است و مصرف‌کنندگان از آن به‌عنوان نشانه‌ای برای پذیرش یا عدم‌پذیرش موادغذایی استفاده می‌کنند. جهت اندازه‌گیری رنگ نمونه‌ها با روش L*a*b* بر اساس روش Afshari و Jouybari Farahnaky (۲۰۱۱) انجام گردید. جهت انجام این آزمون توسط رنگ‌سنج (Monilta، CR-400، ژاپن) نمونه‌های روغن را به مقدار مساوی در ظرف‌های مسطح کوچک شیشه‌ای مشابه از لحاظ جنس، ارتفاع و قطر ریخته و در محیط بسته سفید رنگی توسط دوربین عکس‌برداری شدند. سپس پارامترهای رنگی نمونه L* (معیار روشنایی–سیاهی از ۰ (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید))، a* (رنگ سبز تا قرمز، +a* (رنگ قرمز) و –a* (رنگ سبز)) و b* (رنگ آبی تا زرد، +b* (رنگ زرد) و –b* (رنگ آبی)) با استفاده از نرم‌افزار فتوشاپ تعیین شدند، سپس اختلاف رنگ نمونه‌های حاوی عصاره یا TBHQ با نمونه شاهد با استفاده از رابطه ۳ به‌دست آمد (Afshari-Jouybari & Farahnaky, 2011).

(۳) $$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

در این مطالعه کلیه آزمون‌ها حداقل در ۲ تکرار انجام شد و در کاربرد عصاره‌ها برروی روغن زیتون بکر از طرح کاملاً تصادفی استفاده شد. آنالیز آماری با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۱۹ انجام و نتایج به صورت میانگین± انحراف معیار بیان شدند. تفاوت بین میانگین داده‌ها توسط آنالیز واریانس یکطرفه One way-ANOVA انجام و در صورت وجود اختلاف معنی‌دار بین داده‌ها، از آزمون دانکن در سطح ۹۵٪ (p<۰/۰۵) استفاده گردید.

نتایج و بحث

خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها

فعالیت آنتی‌اکسیدانی، مقدار ترکیبات فنولیک کل و فلاوونوئید در عصاره‌های متانولی و اتانولی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ در جدول‌های ۵ و ۶ ارائه شده است. IC50 نشان‌دهنده مقدار ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بر اساس گالیک اسید است. معمولاً نتایج آزمون DPPH براساس IC50 بیان می‌گردد. IC50 بیانگر غلظتی از نمونه است که موجب ۵۰ درصد بازدارندگی در ظرفیت رادیکالی می‌شود و مقدار آن از طریق رسم منحنی کالیبراسیون بر حسب غلظت‌های مختلف نمونه و محاسبه معادله خط رگرسیون به‌دست می‌آید (Khalighi-Sigaroodi et al., 2012) (شکل ۱).

شکل‌های ۲ و ۳ به‌ترتیب، منحنی استاندارد ترکیبات فنولیک براساس گالیک اسید و فلاوونوئید براساس کوئرستین در عصاره‌های متانولی و اتانولی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج به‌دست آمده مطابق جدول ۵ بیش‌ترین میزان فنول کل در عصاره اتانولی اسپیرولینا برابر با ۴/۵۷ mg GA/g Sp ±۶۷/۱۹ و بیش‌ترین میزان فلاوونوئید در عصاره متانولی اسپیرولینا با مقدار mg QU/g Sp ۱/۱۲ ±۲۶۷/۴۰ است. در بررسی میزان محتوای فنول کل و فلاوونوئید در عصاره اتانولی و متانولی گیاه *گازرخ* مطابق با جدول ۶، بیش‌ترین میزان فنول کل و فلاوونوئید در عصاره اتانولی این گیاه، به‌ترتیب ۰/۷۱ ±۴۳/۴۳ و ۱/۵۷ mg QU/g Mo ±۲۳/۷۸ وجود داشت. همچنین بر اساس بررسی‌های انجام شده جهت خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ، بیش‌ترین IC50 در عصاره اتانولی گیاه *گازرخ* (۱۴۶۹۸۲ mg/ml) وجود داشت و این امر نشان می‌دهد که عصاره گیاه گازرخ دارای بیش‌ترین ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نسبت به عصاره جلبک اسپیرولینا است.

جدول ۵- خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اتانولی اسپیرولینا

Table 5- Antioxidant properties of methanolic and ethanolic extracts of Spirulina

Abundance فراوانی	Antioxidant properties خصوصیات آنتی‌اکسیدانی
	Methanolic extract of *Spirulina platensis* **عصاره متانولی *اسپیرولینا پلاتنسیس***
--	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
32.35± 1.23	**Total phenol* (mg GA/g of spirulina)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم اسپیرولینا)**
267.4± 1.12	**Total Flavonoid* (mg QE/g of spirulina)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم اسپیرولینا)**
	Ethanolic extract of *Spirulina platensis* **عصاره اتانولی *اسپیرولینا پلاتنسیس***
8452.75	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
67.19± 4.57	**Total phenol* (mg GA/g of spirulina)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم اسپیرولینا)**
103.06± 4.91	**Total Flavonoid* (mg QE/g of spirulina)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم اسپیرولینا)**

* داده‌ها بر حسب (میانگین ± انحراف معیار) در دو تکرار گزارش شده است.

* Data were reported in terms of (mean ± standard deviation) in two replications.

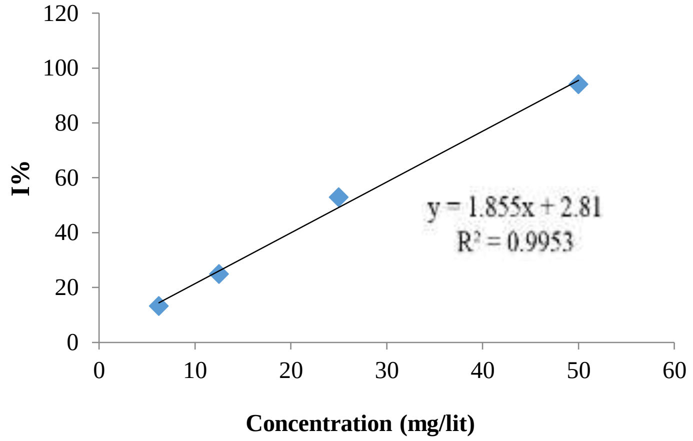
جدول ٦- خصوصیات آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی و اتانولی گیاه گازرخ (*Moringa oleifera*)

Table 6- Antioxidant properties of methanolic and ethanolic extracts of *Moringa oleifera*

Abundance فراوانی	Antioxidant properties خصوصیات آنتی‌اکسیدانی
	Methanolic extract of *Moringa oleifera* **عصاره متانولی گیاه *گازرخ***
--	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
36.48± 0.08	**Total phenol* (mg GA/g of M.oleifera)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم گازرخ)**
14.17± 0.07	**Total Flavonoid* (mg QE/g of M.oleifera)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم گازرخ)**
	Ethanolic extract of *Moringa oleifera* **عصاره اتانولی گیاه *گازرخ***
146982	**IC50 (mg/ml)** **IC50 (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)**
43.43± 0.71	**Total phenol* (mg GA/g of M.oleifera)** **فنول کل* (میلی‌گرم معادل گالیک‌اسید بر گرم گازرخ)**
23.78± 1.57	**Total Flavonoid* (mg QE/g of M.oleifera)** **فلاوونوئید کل* (میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم گازرخ)**

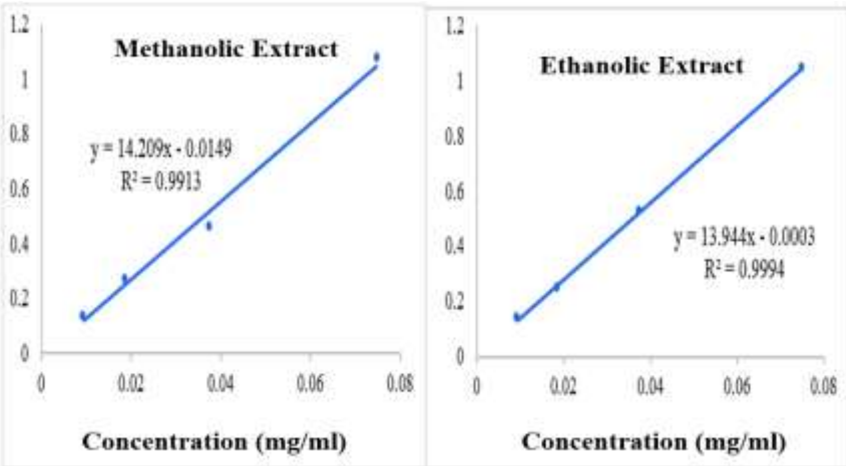
* داده‌ها بر حسب (میانگین ± انحراف معیار) در دو تکرار گزارش شده است.

* Data were reported in terms of (mean ± standard deviation) in two replications



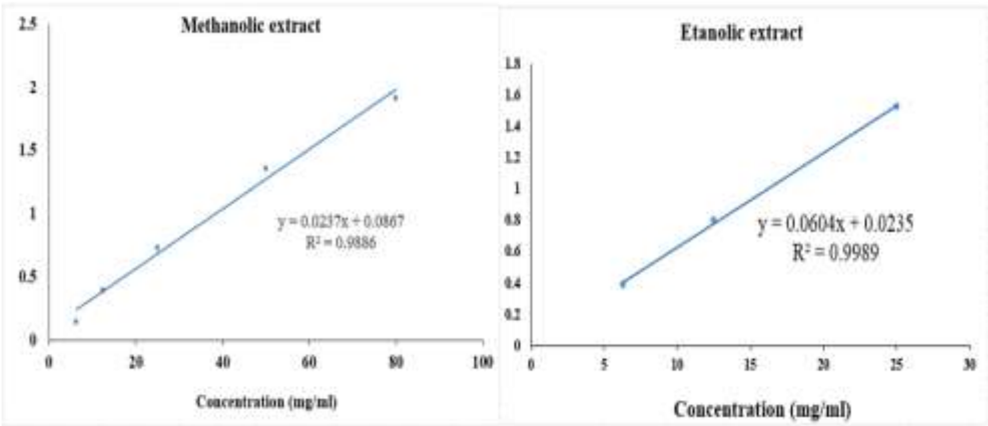
شکل ۱- منحنی استاندارد به روش DPPH (گالیک اسید)

Fig. 1. Standard curve by DPPH method (gallic acid)



شکل ۲- منحنی استاندارد ترکیبات فنولیک کل جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* براساس گالیک اسید

Fig. 2. Standard curve of total phenolic compounds of *spirulina platensis* based on gallic acid



شکل ۳- منحنی استاندارد ترکیبات فلاوونوئیدی جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* براساس کوئرستین

Fig. 3. Standard curve of flavonoid compounds of *spirulina platensis* based on quercetin

فعالیت مهار رادیکال DPPH یکی از روش‌های پرکاربرد برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی اسپیرولینا بر اساس روش DPPH باتوجه به روش توصیف شده توسط Zhang و همکاران (۲۰۰۷) اندازه‌گیری شد. در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها با بررسی فعالیت مهارکنندگی ۵۰ درصد رادیکال آزاد عصاره (IC50) انجام شد. IC50، غلظت مورد نیاز عصاره جهت مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد است و پارامتر خوبی جهت مقایسه اثر آنتی‌اکسیدانی در عصاره‌های مختلف می‌باشد. هرچه خاصیت ضداکسایشی ماده‌ای بیشتر باشد، غلظت مورد نیاز آن ماده جهت مهار ۵۰ درصد رادیکال‌های آزاد کمتر می‌شود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف ناشی از توانایی آن‌ها در دادن اتم هیدروژن یا الکترون جهت مهار رادیکال‌های آزاد است (Szabo et al., 2007). باتوجه به نتیجه به‌دست آمده در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی بالایی در عصاره ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* مشاهده شده است. مطالعات متعددی در زمینه اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره اسپیرولینا صورت گرفته است (Abu Zaid et al., 2015 ; Dartsch, 2008).

اسپیرولینا پلاتنسیس حاوی کاروتنوئید، ویتامین E، فیکوسیانین و کلروفیل است (Abu Zaid et al., 2015). این ترکیبات با داشتن توانایی اهداء هیدروژن در کاهش رادیکال‌های DPPH شناخته شده‌اند (Li et al., 2009). Egea و همکاران (۲۰۱۴) یافتند که افزودن مکمل *اسپیرولینا پلاتنسیس* به کلوچه‌ها باعث افزایش ترکیبات فنولیک کل و پتانسیل آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌شود؛ در این مورد آن‌ها از روش‌های مختلفی برای تعیین فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسپیرولینا از جمله روش مهار رادیکال آزاد DPPH استفاده کردند، آن‌ها متوجه افزایش قابل توجه خواص آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH شدند (Egea et al., 2014).

ترکیبات فنولی به دلیل خواص آنتی‌اکسیدانی آن‌ها نه تنها در میوه‌ها و سبزیجات بلکه در سیانوباکتری‌ها مورد مطالعه قرار گرفته است (Colla et al., 2007). طبق جدول ۵، زیست توده *اسپیرولینا پلاتنسیس* مقدار قابل توجهی از ترکیبات فنولی کل (عصاره متانولی ۳۲/۳۵ و عصاره اتانولی ۶۷/۱۹ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره) را نشان داد. مطابق با نتایج بیش‌ترین میزان ترکیبات فنولی (۶۷/۱۹ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم عصاره) در عصاره اتانولی به ازای ۵ گرم عصاره تعیین شده است. مطالعات متعددی مطابق با یافته‌های مطالعه حاضر وجود دارد؛ Abu Zaid و همکاران (۲۰۱۵) دریافتند که محتوای ترکیبات فنولی در اسپیرولینا تهیه شده بین ۴۰/۴۵– ۲۶/۷۵ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم بوده است (Abu Zaid et al., 2015). Sahu و همکاران (۲۰۱۳) ارتباط معنی‌داری بین محتوای فنولی و مهار رادیکال DPPH در همه سبزیجات برگ‌دار مورد بررسی، نشان داد (p <۰/۰۵؛ r=۰/۹۹۳)؛ آن‌ها در این مورد اظهار داشتند که این امر نشان می‌دهد ظرفیت مهار رادیکال هر عصاره ممکن است به غلظت گروه‌های هیدروکسی فنولی مربوط باشد، آن‌ها دریافتند که بسیاری از مطالعات نشان داده‌اند که بسیاری از پلی‌فنول‌ها به میزان قابل توجهی در فعالیت آنتی‌اکسیدانی نقش دارند و به‌عنوان مهارکننده‌های رادیکال آزاد بسیار مؤثر عمل می‌کنند که عمدتاً به دلیل ویژگی‌های ردوکس آن‌ها است که می‌توانند نقش مهمی در جذب و خنثی‌سازی رادیکال‌های آزاد، غیرفعال کردن مولکول‌های اکسیژن یگانه و سه‌گانه یا تجزیه پراکسیدها داشته باشند.

ترکیبات فلاوونوئید و فنولیکی متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گیاهان در پاسخ به شرایط سخت محیطی تولید می‌شوند. محققان زیادی از مزایای گیاه گازرخ گزارش داده‌اند؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Karageorgou et al., Lalas & Tsaknis, 2002 ; 2017; Iqbal & Bhanger, 2006)، فلاوونوئیدهای زیست فعال (Lin et al., 2018)، ضددیابتی (Bamagous et al., 2018)، ضدباکتریایی (Guillen-Roman et al., 2018) و ضدسرطان (Cuellar-Nunez et al., 2018) گزارش شده است.

مقدار کل فلاوونوئید در عصاره اتانولی در مطالعه حاضر ۲۳/۷۸ میلی‌گرم معادل کوئرستین بر گرم نمونه بود در چندین مطالعه، مقدار فلاوونوئید در عصاره گیاه گازرخ؛ ۹۰ mg/g QE (Xiang et al., 2017)، حدود ۸۰ mg/g QE (Cuellar-Nunez et al., 2018)، و ۲۷ mg/g QE (Sreelatha & Padma, 2009) گزارش شده است. مقدار فنول کل در عصاره اتانولی گیاه گازرخ در این مطالعه ۴۳/۴۳ میلی‌گرم معادل گالیک اسید بر گرم نمونه بود که در مطالعات دیگر میزان فنولیک عصاره این گیاه حدود ۲۰۰۰ mg/g GAE (Xiang et al., 2017)، ۹۰۰ mg/g GAE (Cuellar-Nunez et al., 2018)، ۱۴۶۰ mg/g GAE (Guillen-Roman et al., 2018) و ۵۲ mg/g GAE (Baldisserotto et al., 2018) ثبت شده است. از آنجا که پلی‌فنول‌ها مسئول فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند، مقدار به‌دست آمده از کل پلی‌فنول‌های موجود در عصاره گیاه گازرخ نشان می‌دهد که این گیاه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالایی است (Sreelatha & Padma, 2009). عصاره‌های گیاهی و آنتی‌اکسیدان‌های مشتق شده از گیاهان می‌توانند یک تعداد از اثرات داخل بدن مانند ارتقاء افزایش سنتز محافظت آنتی‌اکسیدانی درون‌زا ایجاد کنند یا خود مستقیماً به‌عنوان آنتی‌اکسیدان عمل کنند (PhD, 1999). همچنین گزارش شده است که ترکیب آنتی‌اکسیدان‌ها با عوامل مختلفی مانند مرحله بلوغ، واریته، شرایط آب و هوایی، بخشی از گیاه

مورد تجزیه و تحلیل، دستکاری پس از برداشت، فرآوری و ذخیره‌سازی متفاوت است (Rodriguez-Amaya, 2003).

فیتوشیمیایی‌ها گروهی از مواد شیمیایی هستند که توسط گیاهان از طریق متابولیسم اولیه یا ثانویه تولید می‌شوند و در برابر تهدیدات موقتی یا دائمی محافظت می‌کنند و در رشد و تولیدمثل گیاه نقش دارند (Samanta et al., 2018). باتوجه به ساختار شیمیایی آن‌ها، فیتوشیمیایی‌ها را می‌توان به سه دسته اصلی تقسیم کرد: ترکیبات حاوی نیتروژن/گوگرد، ترپن و فنول‌ها که شامل فلاوونوئیدها و اسیدهای فنولیک، و لیگنین‌ها است (Heneman & Zidenberg-Cherr, 2008). مطالعات زیادی از بخش‌های مختلف گیاه گازرخ در خصوص ترکیبات فیتوشیمیایی صورت گرفته که از بخش‌هایی مانند برگ، ریشه، گل، دانه انجام شده است (Wang et al., Onsare & Arora, 20152017). به‌طور مثال، برگ‌های گیاه گازرخ برداشت شده در آفریقای جنوبی و نامیبیا شامل حداقل ۱۴ فلاوونوئید با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بسیار بالا همراه با طیف‌سنجی جرمی (UHPLC) بود (Makita et al., 2016). در مطالعه حاضر میزان غلظت فنول کل و فلاوونوئید در عصاره متانولی گیاه گازرخ به‌ترتیب ۳۶/۴۸ mg/g GAE و ۱۴/۱۷ mg/g QE بود که در مطالعه Siddhuraju و Becker (۲۰۰۳) میزان غلظت فنولیک کل و فلاوونوئید در عصاره متانولی ۸۰ درصد از نیکاراگوئه به‌ترتیب ۱۲/۳۳ mg/g GAE و ۱۴/۰۷ mg/g QE بود (Siddhuraju & Becker, 2003) که این مقدار با میزان فلاوونوئید مطالعه حاضر همخوانی داشت. نمونه برگ‌های بالغ خشک شده در هند، که با آب (۶۰۰ ml) به مدت ۲۰-۱۸ ساعت عصاره‌گیری شده دارای فنول کل و فلاوونوئید به‌ترتیب ۴/۵۸ mg/g GAE و mg/g ۲/۷ QE بود (Sreelatha & Padma, 2009). این تفاوت در محتوای فلاوونوئیدها و فنول‌ها در برگ‌های گیاه گازرخ ممکن است به دلیل رشد محیط، تنوع ژنتیکی، روش تیمار نمونه و بلوغ برگ باشد. اگرچه هم متانول و هم اتانول می‌توانند غلظت بالاتری از فلاوونوئید و فنولیک را استخراج کنند، از اتانول به‌عنوان یک حلال مؤثر برای استخراج آنتی‌اکسیدان‌ها به‌طور گسترده‌ای استفاده می‌شود، زیرا متانول خطر محیطی را نشان داده و برای انسان سمی است (M’hiri et al., 2015).

بررسی ترکیبات فنولیک عصاره‌ها

نتایج بررسی ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره‌های جلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ شامل نوع و درصد ترکیبات شناسایی شده در عصاره‌ها که از بررسی طیف‌های حاصل از تزریق عصاره‌ها به دستگاه HPLC به‌دست آمده است، در جدول ۷ آورده شده است. در شکل‌های ۴ و ۵ کروماتوگرام ترکیبات فنولیک موجود در عصاره‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ ارائه شده است. مطالعات متعددی در نقاط مختلف جهان، در رابطه با ترکیبات فنولیک شناسایی شده در جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ گزارش شده است که به‌ترتیب، در جدول ۸ و ۹ خلاصه‌ای از این گزارشات ارائه شده است.

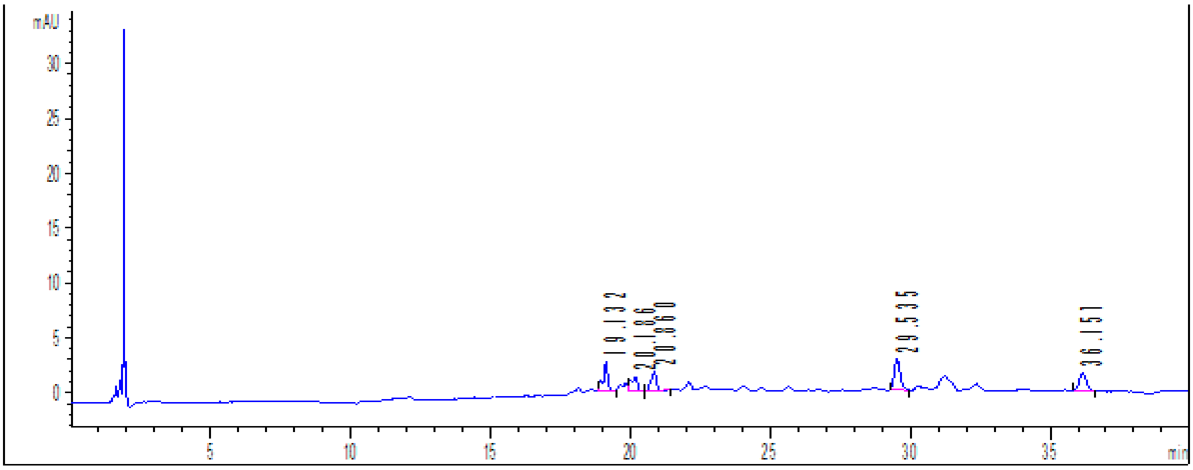
جلبک‌های دریایی یکی از منابع زنده دریایی مهم است و آن‌ها منبع بسیار خوبی از ویتامین‌ها و همچنین مواد معدنی مانند کلسیم، فسفر، سدیم و پتاسیم هستند. فیبرهای غذایی جلبک‌های دریایی مجموعه‌ای از عملکردهای مختلفی مانند آنتی‌اکسیدان، ضدانعقاد، ضدسرطان‌زایی و ضدتومور را انجام می‌دهند (Dhargalkar & Pereira, 2005). گزارش‌ها حاکی از آن است که جلبک دریایی نیز منبع غنی از ترکیبات آنتی‌اکسیدانی است (Kuda et al., 2002). مطالعات متعددی در مورد خصوصیات فیزیولوژیکی برخی از ترکیبات باارزش ضدویروسی و آنتی‌اکسیدانی در جلبک سبز-آبی اسپیرولینا متمرکز شده است (Ozdemir et al., 2004). *اسپیرولینا پلاتنسیس* یا عصاره‌های آن توانایی درمانی مانند جلوگیری از بروز سرطان‌ها، تحریک سیستم ایمنی بدن، کاهش سطح کلسترول خون و فلزات سمی و دفاع در برابر آسیب ناشی از اشعه را نشان داده است (Belay et al., 1993). اسپیرولینا به دلیل ظرفیت تولید بالاتر در مقایسه با منابع معمول مشتق شده از گیاهان، منبع خوبی از ترکیبات مغذی فنولی و فلاوونوئیدی محسوب می‌شود. اسپیرولینا حاوی گروه‌های مختلفی از فلاوونوئیدها مانند ایزوفلاون، فلاونول‌ها و فلاونون‌ها است. این فنول‌های طبیعی طیف گسترده‌ای از خواص شیمیایی و بیولوژیکی از جمله فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و مهار رادیکال‌های آزاد را دارند. علاوه براین، مقدار متفاوت محتوای فنولیک کل در عصاره‌های مختلف این ریزجلبک را می‌توان به عوامل جغرافیایی، فیزیولوژیکی، فاکتورهای محیطی و شرایط کشت نسبت داد (Kepekçi & Saygideger, 2012). Seghiri و همکاران (Seghiri et al., 2019) در شناسایی و تعیین ترکیبات فنولی، در مجموع ۲۰ ترکیب فنولیک و فلاوونوئید با استفاده از HPLC-DAD/MS از عصاره استخراج شده ریزجلبک *اسپیرولینا* شناسایی کردند. مقدار اسید فنولیک بسته به شرایط کشت در گونه‌های اسپیرولینا متغیر است (Kepekçi & Saygideger, 2012 ; Pagnussatt et al., 2014).

جدول ۷- نوع و درصد ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره‌های جلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ

Table 7- Type and percentage of phenolic compounds identified in *S. platensis* and *M. oleifera* extracts

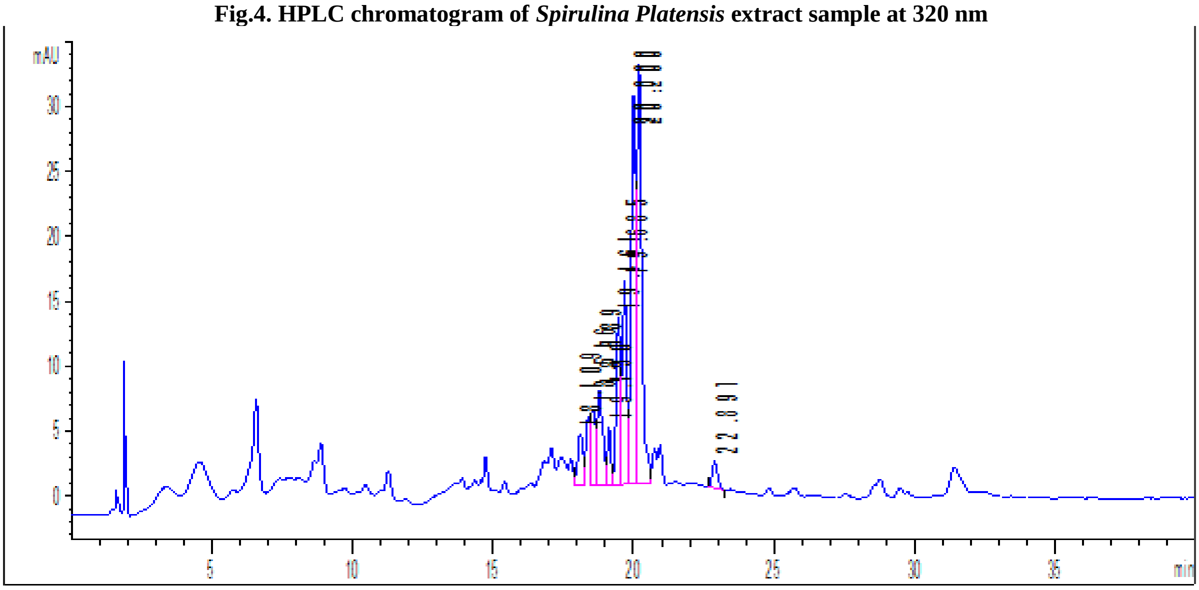
Phenolic compounds ترکیبات فنولیک	The amount of compounds (mg/lit) میزان ترکیبات (میلی‌گرم بر لیتر) *M. oleifera* extract عصاره گیاه گازرخ	 *S. platensis* extract عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس	Retention time (min) زمان بازداری (دقیقه)
کاتچین Catechin	12.98	ND	8.3
کوئرستین Quercetin	2.04	ND	21.6
وانیلین Vanilin	0.42	ND	13.5
هسپریدین Hesperedin	3.50	ND	18.5
هسپرتین Hesperetin	6.37	ND	22.4
Rosmarinic acid رزمارینیک اسید	5.79	4.62	19.2

⁎ ND= Not Detected



شکل ٤- کروماتوگرام HPLC نمونه عصاره *اسپیرولینا پلاتنسیس* در طول موج ۳۲۰ نانومتر

Fig.4. HPLC chromatogram of *Spirulina Platensis* extract sample at 320 nm



شکل ٥- کروماتوگرام HPLC نمونه عصاره گیاه گازرخ در طول موج ۳۲۰ نانومتر

Fig.5. HPLC chromatogram of *Moringa oleifera* extract sample at 320 nm

جدول ۸- مقایسه میزان ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره جلبک *اسپیرولینا* در مطالعات مختلف با مطالعه حاضر

Table 8– Comparison of phenolic compounds detected in *Spirulina platensis* extract in different studies with the present study

Spirulina platensis extract عصاره جلبک اسپیرولینا		
phenolic compounds **ترکیبات فنولیک**	**amount of compounds** **میزان ترکیبات**	**Reference** **منبع**
Catechin **کاتچین**	584.53 ND	Seghiri et al., 2019 مطالعه حاضر current study
Gallic acid **گالیک اسید**	396 2.13 ND	De Souza et al., 2015 Seghiri et al., 2019 مطالعه حاضر current study
Quercetin **کوئرستین**	0.04 ND	Seghiri et al., 2019 مطالعه حاضر current study
Vanilin **وانیلین**	16.24 ND	Seghiri et al., 2019 مطالعه حاضر current study
Rosmarinic acid **رزمارینیک اسید**	0.18 5.79	Seghiri et al., 2019 مطالعه حاضر current study
Caffeic acid **کافئیک اسید**	347 ND	De Souza et al., 2015 مطالعه حاضر current study
Salicylic acid **سالیسیلیک اسید**	54 ND	De Souza et al., 2015 مطالعه حاضر current study
Trans-Cinnamic acid **ترانس-سینامیک اسید**	0.08 3.5 ND	Seghiri et al., 2019 De Souza et al., 2015 مطالعه حاضر current study

جدول ۹- مقایسه میزان ترکیبات فنولیک شناسایی شده در عصاره گیاه *گازرخ* در مطالعات مختلف با مطالعه حاضر

Table 9- Comparison of phenolic compounds detected in *Moringa oleifera* extract in different studies with the present study

Moringa oleifera extract عصاره گیاه گازرخ		
phenolic compounds **ترکیبات فنولیک**	**amount of compounds** **میزان ترکیبات**	**Reference** **منبع**
Catechin **کاتچین**	10.08 12.98	Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Gallic acid **گالیک اسید**	534.4 83.59 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Quercetin **کوئرستین**	807 92.73 2.04	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Vanilin **وانیلین**	0.42	current study مطالعه حاضر
Hesperedin	3.50	current study

هسپریدین		مطالعه حاضر
Hesperetin **هسپرتین**	6.37	current study مطالعه حاضر
Rosmarinic acid **رزمارینیک اسید**	5.79	current study مطالعه حاضر
Chlorogenic acid **کلروژنیک اسید**	488.5 57.24 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 مطالعه حاضر
Ellagic acid **الاژیک اسید**	189.1 45.83 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Kaempferol **کامفرول**	497.6 58.15 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Rutin **روتین**	190 17.05 ND	Verma et al., 2009 Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Caffeic acid **کافئیک اسید**	10.47 ND	Oyeniran et al., 2020 current study مطالعه حاضر
Ferulic acid **فرولیک اسید**	128.2 ND	Verma et al., 2009 current study مطالعه حاضر

متابولیت‌های ثانویه گیاهی، ترکیب‌های آلی هستند که مستقیماً در رشد، نمو یا تولیدمثل گیاه دخیل نیستند. این ترکیبات دارای ساختار شیمیایی پیچیده‌تری نسبت به متابولیت‌های اولیه (مثلاً اسیدهای آمینه) که برای بقاء زندگی سلول‌ها ضروری‌اند می‌باشند. اسانس‌ها، فلاوونوئیدها و رزمارینیک اسید از جمله مهم‌ترین این ترکیب‌ها هستند. رزمارینیک اسید یک ترکیب اسید فنولی است که در گیاه به‌عنوان ضدویروس، ضدباکتری و ضدالتهاب عمل کرده و همچنین از خواص آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار می‌باشد (Petersen & Simmonds, 2003). رزمارینیک اسید به‌عنوان داروی گیاهی بالقوه محسوب شده و به‌خاطر خواص آنتی‌اکسیدانی قوی آن مورد توجه قرار گرفته است. این ترکیب در جنوب اروپا، ژاپن و هند برای درمان بسیاری از بیماری‌ها از جمله سردرد، درد معده، دیابت، رفع نیش حشرات و آکنه استفاده می‌شود (Petersen & Simmonds, 2003). رزمارینیک اسید یک ترکیب فنولی با خاصیت آنتی‌اکسیدنی است که در گیاهان تیره‌های گاوزبان[1] و نعناعیان[2] یافت می‌شود (Petersen & Simmonds, 2003). رزمارینیک اسید ترکیب اصلی رزماری است که به‌عنوان مواد افزودنی غذایی بخصوص در غذاهای مدیترانه‌ای مورد استفاده قرار گرفته و اثرات نگهدارندگی آن با عمل آنتی‌اکسیدانی نسبت داده شده است (Martinez-Tome et al., 2001). رزمارینیک اسید می‌تواند به‌عنوان یک مهارکننده قوی سنتزهای سوپراکسید و NO و یک محافظ در برابر آسیب ناشی از پراکسی نیتریت عمل کند؛ مکانیسم‌های مهار آن‌ها نشان داده که تا حدی مبتنی بر توانایی مهار فسفوریلاسیون سرین است (Qiao et al., 2005).

ترکیبات فلاوونوئید و فنولیک متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط گیاهان در پاسخ به شرایط سخت محیطی تولید می‌شوند. محققان زیادی از مزایای گیاه گازرخ گزارش داده‌اند؛ فعالیت آنتی‌اکسیدانی (Karageorgou et al., 2017; Lalas & Tsaknis,

1 *Boraginaceae*
2 *Lamiacea*

2002) ، فلاوونوئیدهای زیست فعال (Lin et al., 2018)، اثرات ایمنی‌بخش و ضددیابتی (Bamagous et al., 2018)، ضدباکتریایی و ضدسرطان (Guillén-Román et al., 2018) گزارش شده است.

Verma و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی پلی‌فنول‌های آنتی‌اکسیدانی انجام شده توسط HPLC در عصاره برگ‌های گیاه گازرخ بیان کردند که عصاره این گیاه حاوی اسیدهای فنولیک (گالیک اسید، کلروژنیک، الاژیک و فرولیک) و فلاوونوئیدها (کامفرول، کوئرستین و روتین) است (Verma et al., 2009) . فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولی اصولاً مربوط به ویژگی‌های احیاءکنندگی آن‌ها می‌باشد. این ترکیبات قادرند به‌واسطه قدرت احیاءکنندگی خود به‌عنوان یک عامل اهداءکننده هیدروژن یا الکترون و یا غیرفعال‌کننده اکسیژن یگانه عمل کرده و از این طریق مانع از انجام فرآیندهای اکسیداسیون شوند. فلاوونوئیدها دارای خاصیت ضدمیکروبی، ضدالتهابی، ضدتب، ضدآلرژی و خواص ضداکسیدان می‌باشند. کاتچین‌ها نوعی آنتی‌اکسیدان و از مهم‌ترین فلاوونوئیدها به‌شمار می‌روند. فراوان‌ترین و فعال‌ترین کاتچین از نظر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اپی‌گالوکاتچین گالات است (Dalluge & Nelson, 2000). پژوهش‌ها نشان داده است که کاتچین از طریق مهار رادیکال‌های آزاد و کاهش آسیب اکسیداتیو DNA از القاء آپوپتوز در سلول‌های آسیب‌دیده جلوگیری می‌کند (Ishii et al., 2008). به‌علاوه، پژوهش‌ها نشان داده‌اند کاتچین‌ها به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان قوی با مهار استرس اکسیداتیو و پراکسیداسیون لیپیدی از تخریب بافتی جلوگیری می‌کند و نیز از طریق تقویت سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی موجب محافظت بافتی می‌شود. همچنین می‌توانند میزان آنتی‌اکسیدان‌های اندوژن و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی را افزایش دهند (Senanayake, 2013). گزارش شده است کاتچین به‌عنوان یک آنتی‌اکسیدان طبیعی ظرفیت آنتی‌اکسیدانی پلاسما را افزایش داده و موجب کاهش تجمع رادیکال‌های آزاد سلولی می‌شود. همچنین با کاهش شرایط استرس اکسیداتیو مانع از اثر عوامل جهش‌زا روی کروموزوم‌ها می‌شود (Crespy & Williamson, 2004). از گروه ترکیبات فنولی، به وانیلین در صنایع غذایی توجه فراوان شده است. وانیلین یا ۴-هیدروکسی-۳-متوکسی بنزآلدهید ($C_8H_8O_3$)، به‌طور طبیعی در دانه گیاه *Vanilla planifolia* یافت می‌شود (Walton et al., 2003). از دیگر ترکیبات فنولی با وزن مولکولی کم، وانیلین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدمیکروبی را نشان می‌دهد از این‌رو پتانسیل استفاده به‌عنوان نگهدارنده مواد غذایی را دارد (Davidson & Naidu, 2000). این ماده در برابر باکتری‌های عامل فساد مواد غذایی، گرم مثبت و گرم منفی عمل کرده و حتی نشان داده شده که در برابر کپک‌ها و مخمرها در پوره میوه و محیط رشد آزمایشگاهی مؤثر است (Fitzgerald et al., 2003).

هسپریدین یک فلاوونوئید گلیکوزیدی است که در تحقیقات متعدد اثر آنتی‌اکسیدانی این ترکیب به اثبات رسیده است (Tirkey et al., 2005). این مولکول دارای ساختار کریستالی پیچیده است که آن را از دیگر گلیکوزیدهای مشابه متمایز می‌کند که این باعث تأثیر بر حلالیت و سایر خواص فیزیکی و مشکل شدن خالص‌سازی آن می‌گردد. به‌طور کلی قابلیت آنتی‌اکسیدانی هسپریدین به تعداد و ترتیب گروه‌های هیدروکسیل و میزان اتصالات ساختاری آن بستگی دارد (Ghorbani et al., 2016). نقش محافظتی هسپریدین به‌وسیله متوقف کردن رادیکال‌های آزاد تشکیل شده و در آن احیای سطوح آنتی‌اکسیدان‌های غیرآنزیمی نشان داده شده است (Pradeep et al., 2008). به‌علاوه، محققن دریافته‌اند که هسپریدین در محافظت لیپوزوم‌ها از پراکسیداسیون ناشی از تابش فرابنفش مؤثر بوده است که احتمالاً به علت مهار رادیکال‌های آزاد اکسیژن تولید شده به‌وسیله تابش فرابنفش است (Bonina et al., 1996).

بررسی تغییرات پراکسید

نتایج تغییرات عدد پراکسید در نمونه‌های روغن در جدول ۱۰ ارائه شده است. تغییرات عدد پراکسید از زمان تولید و افزودن عصاره به مدت زمان ۸ ساعت در فواصل ۲ ساعت بررسی گردید. مطابق با نتایج ارائه شده در جدول ۱۰ کمترین میزان عدد پراکسید (meq O_2/kg ۰/۳۸) مربوط به نمونه حاوی عصاره گیاه گازرخ در زمان سوم نگهداری بود، بیش‌ترین میزان پراکسید در نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ در محدوده ۱۵ meq O_2/kg مشاهده گردید.

جدول ۱۰- بررسی روند تغییرات عدد پراکسید (meq O_2/kg) نمونه‌های روغن زیتون بکر*

Table 10- Evaluation of the trend of changes in peroxide index (meq O_2/kg) of virgin olive oil samples*

Storage time (hr.) زمان نگهداری (ساعت)	Control sample نمونه شاهد	Sample containing spirulina extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا	Sample containing Moringa extract نمونه حاوی عصاره گازرخ	Sample containing spirulina and Moringa extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا و گازرخ	Sample containing TBHQ نمونه حاوی TBHQ

First time **زمان اول**	9.48± 0.13^{aD**}	3.89± 0.065^{bA}	1.19± 0.00^{cA}	1.97± 0.00^{cA}	9.53 ±0.045^{aD}
Second time **زمان دوم**	12.01± 0.13^{aC}	3.95 ±0.025^{bA}	1.97± 0.015^{cA}	1.91 ±0.005^{cB}	12.04 ±0.05^{aC}
Third time **زمان سوم**	13.10± 0.14^{aB}	1.98 ±0.005^{bB}	0.38± 0.005^{dC}	0.78 ±0.01^{cD}	13.02 ±0.12^{aB}
Fourth time **زمان چهارم**	15.72± 0.12^{aA}	1.18 ±0.005^{bC}	1.18± 0.005^{bB}	0.78 ±0.005^{cD}	15.76 ±0.16^{aA}
Fifth time **زمان پنجم**	15.65± 0.2^{aA}	0.79 ±0.005^{bD}	1.19± 0.005^{bB}	1.16 ±0.015^{bC}	15.38 ±0.16^{aA}

* داده‌ها بر حسب (میانگین± خطای استاندارد) در دو تکرار گزارش شده است. * Data are reported in terms of (mean± standard error) in two replications.

**حروف کوچک (a-d) مشابه در هر ردیف و حروف بزرگ (A-D) مشابه در هر ستون نشان‌دهنده عدم اختلاف معنادار (p<۰/۰۵) بر اساس آزمون دانکن بین داده‌ها است.

**The similar small letters (a-d) in each row and the similar capital letters (A-D) in each column indicate no significant difference (p <0.05) based on Duncan's test between data.

نمونه شاهد و روغن حاوی آنتی‌اکسیدان مصنوعی TBHQ در طی این بازه زمان، افزایش عدد پراکسید را نشان دادند که این افزایش نسبت به زمان اول اختلاف معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵). نمونه‌های روغن حاوی عصاره‌های گیاهی کاهش معنی‌داری در زمان پایانی نگهداری نسبت به زمان اول افزودن عصاره‌ها نشان دادند (p<۰/۰۵)؛ با این حال که هر سه نمونه حاوی عصاره در زمان پایان نگهداری اختلاف معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (p>۰/۰۵). نمونه‌های حاوی عصاره در زمان پایان نگهداری با نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ اختلاف معنی‌داری داشتند (p<۰/۰۵). تیمار شاهد و تیمار حاوی TBHQ دارای بالاترین مقدار عدد پراکسید بود و با تیمارهای حاوی آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در تمامی زمان‌ها اختلاف معنی‌داری وجود دارد (p <۰/۰۵). با این‌حال، نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ در زمان‌های پایانی نگهداری میزان عدد پراکسید از میزان ۲۰ میلی-اکی‌والان پراکسید در کیلوگرم (باتوجه به اصل عمومی فساد روغن در این نقطه) بیشتر افزایش نیافت که این امر نشان‌دهنده مقاومت بالای روغن زیتون بکر در برابر اکسیداسیون به‌دلیل آنتی‌اکسیدان‌های ذاتی و سطح غیراشباعیت پایین است (Keramat & Golmakani, 2016). نتایج حاکی از آن است که با افزودن عصاره‌های ریزجلبک اسپیرولینا و گیاه گازرخ به روغن زیتون بکر مقدار پراکسید در نمونه حاوی عصاره‌ها نسبت به نمونه شاهد کاهش یافته و عدد پراکسید در این تیمارها مقاومت بیشتری در مقابل افزایش نشان داد. کاهش اندیس پراکسید در اثر افزودن عصاره‌ها را می‌توان به ترکیبات فنولیک و سایر ترکیبات ضداکسایشی موجود در عصاره‌ها نسبت داد. ترکیبات فنولیک با داشتن خاصیت ضداکسایشی، بیشترین اهمیت را در پایداری اکسیداتیو روغن دارند. ترکیبات پلی‌فنولیک با از دست دادن یک اتم هیدروژن به‌صورت رادیکال آزاد در آمده، از گسترش واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون جلوگیری می‌کنند.

احتمال دیگر در بیان دلیل کاهش پراکسید مربوط به شکست پراکسید و هیدروپراکسیدها و تبدیل آن‌ها به ترکیبات ثانویه نظیر آلدئیدها، کتون‌ها و کتواسیدها می‌باشد، در نتیجه کاهش میزان اندیس پراکسید را به دنبال داشته است (Dehlei et al., 2016). بنابر گزارش ارائه شده توسط Tabee و همکاران (۲۰۰۸)، میزان پراکسید روغن زیتون با افزودن گیاهان و ادویه‌های ضداکسایشی کاهش می-یابد که این گزارش با نتایج به‌دست آمده در این مطالعه همخوانی دارد (Tabee et al., 2008).

ترکیبی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی در *اسپیرولینا پلاتنسیس*، مانند آلفا و بتا-کاروتن، زانتوفیل، کریپتوزانتین، زاگزانتین، ویتامین C، توکوفرول، ترکیبات قطبی پلی‌فنولیک و به‌ویژه رنگدانه فیکوسیانین از طریق برهم‌کنش‌های سینرژیستی، مهار رادیکال‌های آزاد و مکانیسم شلاته‌کنندگی فلزات، از پراکسیداسیون لیپیدی ممانعت می‌کند و با این فرآیند اکسیداسیون را به تأخیر می‌اندازد (Samad et al., 2007).

نتایج تغییرات عدد پراکسید در شرایط تسریع شده نشان داد که نمونه شاهد و نمونه حاوی TBHQ نسبت به نمونه‌های حاوی عصاره با سرعت بیشتری افزایش یافت. با توجه به ترکیبات پلی‌فنولیک موجود در عصاره گیاه گازرخ و عصاره اسپیرولینا می‌توان بیان کرد که کاهش سرعت اکسیداسیون در نمونه‌های حاوی عصاره با ظرفیت آنتی‌اکسیدانی این ترکیبات ارتباط مستقیمی دارد. Morsy و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که مهار اکسیداسیون و افزایش ماندگاری روغن زیتون (تا ۴۷۵ روز در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) در نتیجه محتوای فنولی و فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالای عصاره اسپیرولینا موجود در نمونه روغن است (Morsy et al., 2019). بنابراین، توانایی توقف مراحل ابتدایی و پیشرفت واکنش‌های زنجیره‌ای اکسیداسیون توسط عصاره گیاه گازرخ و اسپیرولینا عمدتاً به دلیل وجود این ترکیبات است. از طرفی دیگر، در مطالعه‌ای بیان شده که مخلوط ترکیبات فعال زیستی و محصولات جانبی آن‌ها موجود در عصاره‌های گیاهی و

محصولات طبیعی مختلف اثرات هم‌افزایی ایجاد می‌کند (Sonam & Guleria, 2017).

همچنین مطابق با نتایج Hajimehdipoor و همکاران (۲۰۱۴) استفاده از دو و یا بیشتر برخی از ترکیبات فنولی و فلاوونوئید می‌تواند اثرات آنتی‌اکسیدانی و به عبارتی اثرات هم‌افزایی را افزایش دهد؛ با این‌حال، لازم به ذکر است که ترکیب دوتایی گالیک اسید و رزمارینیک اسید، کافئیک اسید، کلروژنیک اسید، روتین و کوئرستین اثر هم‌افزایی بیش‌تری نسبت به ترکیب سه‌تایی آن‌ها دارد در حالی‌که در ترکیب دوتایی آن‌ها هیچ‌گونه اثر هم‌ستیزی مشاهده نشده است. از طرفی برخی ترکیبات فنولی و فلاونوئید، می‌توانند اثرات هم‌ستیزی نشان دهند؛ در مطالعه‌ای در همین راستا در ترکیبات سه‌تایی روتین، کافئیک اسید، رزمارینیک اسید (۲۱/۸- درصد) و روتین، کلروژنیک اسید و کافئیک‌اسید (۱۵/۸- درصد) بیش‌ترین اثرات هم‌ستیزی را نشان داده‌اند (Hajimehdipoor et al., 2014).

بررسی تغییرات ضریب شکست

نتایج تغییرات ضریب شکست روغن زیتون بکر در جدول ۱۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که تغییرات ضریب شکست در تمام تیمارها در محدوده استاندارد است و افزودن عصاره‌ها برروی این فاکتور تأثیر منفی نداشته است.

جدول ۱۱- بررسی روند تغییرات ضریب شکست نمونه‌های روغن زیتون بکر

Table 11- Investigation of the trend of changes in the refractive index of virgin olive oil samples

Standard range (1446) محدوده استاندارد (١٤٤٦)	Abundance فراوانی	Treatments تیمار
1.4677- 1.4705	1.4677	Control sample نمونه شاهد
	1.4579	Sample containing spirulina extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا
	1.4678	Sample containing Moringa extract نمونه حاوی عصاره گازرخ
	1.4678	Sample containing spirulina and Moringa extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا و گازرخ
	1.4677	Sample containing TBHQ نمونه حاوی TBHQ

روغن‌ها و چربی‌های مختلف ضریب شکست خاص خود را دارند لذا این ویژگی، برای تشخیص هویت و تعیین خلوص روغن‌ها و چربی‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. ضریب شکست در کنترل پیشرفت واکنش‌ها نظیر هیدروژناسیون و ایزومریزاسیون کاتالیزوری روغن‌ها مفید است. همچنین برای تشخیص اکسایش روغن نیز از ضریب شکست استفاده می‌شود؛ براین اساس شاید بتوان علت عدم تغییر ضریب شکست در بین نمونه‌ها را چنین بیان کرد که چون تغییرات پراکسید در حدی پایین‌تر از میزان استاندارد تعیین شده بوده تغییری در میزان ضریب شکست نمونه‌ها مشاهده نشده است. درجه حرارت و اشباعیت از عوامل مؤثر بر ضریب شکست هستند. از طرفی ضریب شکست نماد خوبی از تغییر میزان سیرنشدگی روغن‌ها و چربی‌ها بر اثر فرآیند هیدروژن‌دهی است. ضریب شکست روغن‌ها تابعی از وزن مولکولی، طول زنجیر اسید چرب، درجه سیرنشدگی و میزان پیوندهای دوگانه مزدوج آن‌ها است (Nichols & Sanderson, 2003). مطالعه صورت گرفته توسط Keramat و همکاران (۲۰۱۴) که به بررسی اثر اسانس رزماری بر روغن زیتون بکر پرداخته بودند ضریب شکست روغن در محدوده استاندارد بود که با پژوهش حاضر همخوانی دارد (Keramat et al., 2014).

بررسی تغییرات رنگ (L*, a*, b*)

نتایج بررسی تغییرات رنگ در شاخص‌های L*، a* و b* بعد از افزودن عصاره‌های گیاهی به روغن زیتون بکر در جدول ۱۲ گزارش شده است. پارامتر L* معیار روشنایی در روغن بوده و از ۰ (سیاه) تا ۱۰۰ (سفید) متغیر است.

با توجه به نتایج ارائه شده پارامتر L* در نمونه حاوی عصاره گیاه گازرخ کاهش معنی‌داری نسبت به نمونه شاهد وجود داشت ($p<0.05$)، ولی با نمونه‌های حاوی عصاره اسپیرولینا و نمونه حاوی مخلوط هردو عصاره و نمونه حاوی TBHQ اختلاف معنی‌داری نداشت ($p>0.05$). شاخص a* بیانگر رنگ بین سبز تا قرمز می‌باشد. اعداد مثبت a* نشان‌دهنده رنگ قرمز و اعداد منفی نشان دهنده رنگ سبز می‌باشد. باتوجه به نتایج ارائه شده پارامتر a* در نمونه حاوی عصاره گازرخ و نمونه حاوی مخلوط عصاره‌ها افزایش معنی-

داری نسبت به سایر نمونه‌ها نشان داد (p<۰/۰۵) که نشان‌دهنده این است که رنگ سبز روغن زیتون بکر در این دو نمونه کاهش یافته است. محدوده پارامتر b* از ۱۰۰+ (زرد) تا ۱۰۰- (آبی) است که با توجه به نتایج جدول ۱۲ نمونه حاوی مخلوط عصاره‌ها کاهش زردی معنی‌داری در روغن زیتون بکر نسبت به سایر نمونه‌ها داشته است (p<۰/۰۵).

جدول ۱۲- بررسی روند تغییرات رنگ (L*, a*, b*) نمونه‌های روغن زیتون بکر*

Table 12- Investigation of color change trends (L *, a *, b *) of virgin olive oil samples*

Color index شاخص رنگ	Control sample نمونه شاهد	Sample containing spirulina extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا	Sample containing Moringa extract نمونه حاوی عصاره گازرخ	Sample containing spirulina and Moringa extract نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا و گازرخ	Sample containing TBHQ نمونه حاوی TBHQ
L*	57.86± 1.05[a**]	56.57± 1.74[ab]	53.00± 1.25[b]	54.29± 1.12[ab]	56.71± 0.80[ab]
a*	-5.00± 0.00[b]	-4.71± 0.42[b]	-2.29± 0.28[a]	-2.00± 0.52[a]	-4.29± 0.36[b]
b*	37.29± 1.68[a]	35.29± 1.39[a]	30.00± 4.95[a]	18.43± 1.39[b]	30.71± 2.23[a]
ΔE	0	8.05± 1.63[b]	16.10± 2.11[a]	19.99± 1.68[a]	8.40± 1.97[b]

* داده‌ها بر حسب (میانگین± خطای استاندارد) در دو تکرار گزارش شده است. * Data are reported in terms of (mean± standard error) in two replications.

**حروف کوچک (a-b) مشابه در هر ردیف نشان دهنده عدم اختلاف معنادار (p<۰/۰۵) بر اساس آزمون دانکن بین داده‌ها است.

**The similar small letters (a-d) in each row indicate no significant difference (p <0.05) based on Duncan's test between data.

افزودن عصاره اسپیرولینا به تنهایی روغن زیتون بکر اختلاف معنی‌داری را با نمونه شاهد در تمام پارامترهای رنگی ایجاد نکرد (p>۰/۰۵) ولی نمونه حاوی عصاره گیاه گازرخ و نمونه حاوی ترکیب هردو عصاره در تمام پارامترهای رنگ اختلاف معنی‌داری با نمونه شاهد نشان دادند (p <۰/۰۵). از طرفی دیگر، فاکتور اختلاف رنگ (ΔE) نیز تأیید کننده این موضوع است که اختلاف رنگی میان نمونه-های حاوی عصاره گیاه گازرخ و نمونه حاوی ترکیب هردو عصاره با نمونه شاهد وجود دارد ولی در نمونه حاوی عصاره اسپیرولینا مقدار عددی پایین اختلاف رنگ (ΔE) تأیید کرد که این نمونه با نمونه شاهد اختلاف رنگی زیادی وجود ندارد. در واقع می‌توان بیان کرد افزودن عصاره اسپیرولینا به روغن زیتون بکر اثر نامطلوبی بر رنگ روغن نداشته است. رنگ به‌عنوان مهم‌ترین ویژگی و خاصیت در آگاهی یافتن از کیفیت محصول شناخته می‌شود. رنگ روغن زیتون بکر در اثر رنگ‌های سبز و زرد به علت وجود کاروتنوئیدها و کلروفیل‌ها است. رنگ روغن زیتون تحت تأثیر شاخص رسیدگی، رقم زیتون، منطقه تولید، نحوه استخراج و شرایط نگهداری قرار می‌گیرد (Boskou et al., 2006). اختلاف رنگی نمونه‌های حاوی عصاره با نمونه شاهد نشان می‌دهد که افزودن عصاره‌ها به روغن باعث کاهش شاخص روشنایی روغن (کاهش در اندیس L*)، کاهش رنگ سبز (کاهش اندیس a* به سمت مثبت) (هرچه شاخص a* منفی‌تر باشد، رنگ سبز روشن‌تر را نشان می‌دهد) و کاهش رنگ زرد روغن (کاهش اندیس b*) شده‌اند. نتایج حاصل از این پارامترها می‌تواند بیانگر مشارکت رنگدانه‌های موجود در عصاره‌های اسپیرولینا و گیاه گازرخ در رنگ روغن زیتون بکر باشد. در مطالعه Ayadi و همکاران (۲۰۰۹) تمام پارامترهای رنگ L*,a*,b* در نمونه‌های روغن زیتون فرابکر حاوی عصاره گیاهان آروماتیک تونسی نسبت به نمونه شاهد کاهش یافت. این محققان، علت این تغییر را به مهاجرت ترکیبات از گیاهان آروماتیک به روغن زیتون در طی فرآیند ماسراسیون نسبت دادند و بیان کردند که این ترکیبات می‌توانند اسیدهای آلی، ترکیبات فنولیک، رنگدانه‌ها، آنتی‌اکسیدان‌ها و اسانس‌ها باشند (Ayadi et al., 2009)؛ نتایج این محققان با مطالعه حاضر همخوانی دارد. در این مطالعه علت بررسی رنگ روغن زیتون به دلیل بررسی خصوصیات ظاهری روغن بوده، از آنجا که افزودن دو آنتی‌اکسیدان طبیعی از عصاره‌های اسپیرولینا و گیاه گازرخ که خود دارای رنگ سبز هستند می‌تواند بر خصوصیات حسی و ظاهری مطلوب محصول اثر منفی بگذارد و بازارپسندی محصول کاهش یابد. از طرفی به دلیل اینکه یکی از خصوصیات ظاهری روغن زیتون، رنگ آن است و از نظر مصرف کننده دارای اهمیت است لذا بررسی فاکتور رنگ در کنار سایر خصوصیات مورد ارزیابی قرار گرفت.

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر، فراوانی مواد فعال طبیعی موجود در عصاره‌های ریزجلبک *اسپیرولینا پلاتنسیس* (*Spirulina platensis*) و گیاه گازرخ (*Moringa oleifera*) به‌عنوان مهارکننده‌های رادیکال آزاد عمل کرده و یا جهت محافظت از فنول‌های کل مانند توکوفرول، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان طبیعی در روغن زیتون بکر، در برابر تخریب

اکسیداسیون حرارتی نقش داشته باشند. نتایج نشان داد که ترکیبات مؤثره در عصاره‌های *اسپیرولینا پلاتنسیس* و گیاه گازرخ، ترکیبات پلی‌فنولی رزمارینیک اسید، کاتچین، کوئرستین، وانیلین، هسپریدین، هسپرتین است. از این‌رو، عصاره‌ها سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بکر را کاهش می‌دهند و می‌توان بیان کرد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی هردو عصاره به دلیل اثر تشدیدکنندگی بین ترکیبات فنولی موجود در عصاره‌ها است. تغییرات عدد پراکسید در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد، نشان داد که عصاره‌های اسپیرولینا و گیاه گازرخ به‌صورت جداگانه و هم به‌صورت ترکیب با یکدیگر قادر به کاهش سرعت اکسیداسیون روغن زیتون بکر شده بود و باعث کمتر شدن عدد پراکسید در این سه نمونه شده که قابل مقایسه با آنتی‌اکسیدان سنتزی TBHQ نمی‌باشد. ضریب شکست نمونه‌های روغن با افزودن عصاره‌ها تغییر نکرد و در محدوده استاندارد بود. همچنین اختلاف رنگی نمونه‌های حاوی عصاره در مقایسه با نمونه شاهد نشان داد که افزودن عصاره‌ها به روغن باعث کاهش اندیس *L، کاهش اندیس *a و کاهش اندیس *b شده‌اند. براساس نتایج حاصل از این مطالعه می‌توان بیان کرد که هردو عصاره دارای اثر آنتی‌اکسیدانی قوی هستند که می‌توان از آن‌ها با میزان به‌کار برده شده در مطالعه (۱۰۰۰ppm در ۱۰۰ گرم روغن زیتون فرابکر) برای غذاهایی با چربی بالا و فاسد شدنی به خوبی استفاده کرد. از این‌رو با شناخت اثرات آنتی‌اکسیدانی عصاره اسپیرولینا پلاتنسیس و گیاه گازرخ می‌توان از آن‌ها برای استفاده صنعتی و جایگزینی با آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی بهره برد

منابع

1. Abu Zaid, A. A., Hammad, D. M., & Sharaf, E. M. (2015). Antioxidant and anticancer activity of *Spirulina platensis* water extracts. *International journal of pharmacology*, 11(7), 846-851.
2. Afshari-Jouybari, H., & Farahnaky, A. (2011). Evaluation of Photoshop software potential for food colorimetry. *Journal of food engineering*, 106(2), 170-175. https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.02.034
3. Ayadi, M., Grati-Kamoun, N., & Attia, H. (2009). Physico-chemical change and heat stability of extra virgin olive oils flavoured by selected Tunisian aromatic plants. *Food and chemical toxicology*, 47(10), 2613-2619. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.07.024
4. Baldisserotto, A., Buso, P., Radice, M., Dissette, V., Lampronti, I., Gambari, R., & Vertuani, S. (2018). *Moringa oleifera* leaf extracts as multifunctional ingredients for "natural and organic" sunscreens and photoprotective preparations. *Molecules*, 23(3), 664. https://doi.org/10.3390/molecules23030664
5. Bamagous, G. A., Al Ghamdi, S. S., Ibrahim, I. A. A., Mahfoz, A. M., Afify, M. A., Alsugoor, M. H., Rengarajan, T. (2018). Antidiabetic and antioxidant activity of ethyl acetate extract fraction of *Moringa oleifera* leaves in streptozotocin-induced diabetes rats via inhibition of inflammatory mediators. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 8(6), 320 . DOI: 10.4103/2221-1691.235327
6. Belay, A. (2008). Spirulina (Arthrospira): production and quality assurance. Spirulina in human nutrition and health, 1 .
7. Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., & Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of applied phycology*, 5(2), 235-241. https://doi.org/10.1007/BF00004024
8. Bonina, F., Lanza, M., Montenegro, L., Puglisi, C., Tomaino, A., Trombetta, D., Saija, A. (1996). Flavonoids as potential protective agents against photo-oxidative skin damage. *International Journal of Pharmaceutics*, 145(1-2), 87-94. https://doi.org/10.1016/S0378-5173(96)04728-X
9. Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006). Olive oil composition. In Olive Oil (pp. 41-72): Elsevier. https://doi.org/10.4324/9781003040217
10. Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., & Mendez, J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3), 379-381. https://doi.org/10.1016/S0378-8741(01)00413-5
11. Chang, C. C., Yang, M. H., Wen, H. M., Chern, J. C. (2002). Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10(3).
12. Choonawala, B. B. (2007). Spirulina production in brine effluent from cooling towers. https://doi.org/10.51415/10321/134
13. Cohen, Z. (1997). The chemicals of Spirulina. Spirulina platensis, 175-204.
14. Crespy, V., & Williamson, G. (2004). A review of the health effects of green tea catechins in in vivo animal models. *The Journal of nutrition*, 134(12), 3431S-3440S. https://doi.org/10.1590/S1516-89132007000100020
15. Cuellar-Nuñez, M. L., Luzardo-Ocampo, I., Campos-Vega, R., Gallegos-Corona, M. A., De Mejía, E. G., & Loarca-Piña, G. (2018). Physicochemical and nutraceutical properties of *moringa* (*Moringa oleifera*) leaves and their effects in an in vivo AOM/DSS-induced colorectal carcinogenesis model. *Food research international*, 105, 159-168. https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.11.004
16. Dalluge, J. J., & Nelson, B. C. (2000). Determination of tea catechins. *Journal of chromatography A*, 881 (1-2), 411-424. https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)00062-5

17. Dartsch, P. C. (2008). Antioxidant potential of selected *Spirulina platensis* preparations. Phytotherapy Research: *An International Journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives*, 22(5), 627-633. https://doi.org/10.1002/ptr.2310
18. Davidson, P., & Naidu, A. (2000) .Phyto-phenols. In Natural food antimicrobial systems (pp. 278-307): CRC Press.
19. Dehlei, Z., Danesh, M. F., & Sahari, M. (2016). Comparative investigation of red pepper (*Capsicum annuum* L.) extraction by ultrasonic and thermal methods and effect of it's extract on oxidative stability of virgin olive oil. *Journal of food science & technology*, 13(52), (2008-8787).
20. De Souza, T. D., Prietto, L., de Souza, M. M., & Furlong, E. B. (2015). Profile, antioxidant potential, and applicability of phenolic compounds extracted from *Spirulina platensis. African journal of biotechnology*, 14(41), 2903-2909. DOI: 10.5897/AJB2015.14926
21. Dhargalkar, V., & Pereira, N. (2005). Seaweed: promising plant of the millennium .
22. Egea, B. C. B. M. B., Campos, A. L. M. J. I., DE Carvalho–Eliane, J. C. M., & Danesi, D. G. (2014). Antioxidant and nutritional potential of cookies enriched with *Spirulina platensis* and sources of fibre. *Journal of food and nutrition Research* (ISSN 1336-8672), 53(2), 171-179.
23. Fayyad, R. J., Mohammed Ali, A., Dwaish, A. S., & Khayoon, A. (2019). Anticancer Activity of *Spirulina platensis* Methanolic extracts against l20b and MCF7 Human Cancer Cell Lines. *Plant Arch*, 19(1), 1419-1426 .
24. Fitzgerald, D. J., Stratford, M., & Narbad, A. (2003). Analysis of the inhibition of food spoilage yeasts by vanillin. *International journal of food microbiology*, 86(1-2), 113-122 .
25. Frankel, E. N. (2010). Chemistry of extra virgin olive oil: adulteration, oxidative stability, and antioxidants. *Journal of agricultural and food chemistry*, 58(10), 5991-6006. https://doi.org/10.1021/jf1007677
26. Ghorbani, Z., Haddadi, G., & Fardid, R. (2016). Hesperidin as a natural Radio-Protector. *Journal of fasa university of medical sciences*, 5(4), 449-459.
27. Guillén-Román, C. J., Guevara-González, R. G., Rocha-Guzmán, N. E., Mercado-Luna, A., & Perez-Perez, M .C. I. (2018). Effect of nitrogen privation on the phenolics contents, antioxidant and antibacterial activities in *Moringa oleifera* leaves. *Industrial crops and products*, 114, 45-51. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.01.048
28. Hajimehdipoor, H., Shahrestani, R., & Shekarchi, M. (2014). Investigating the synergistic antioxidant effects of some flavonoid and phenolic compounds. *Research journal of pharmacognosy*, 1(3), 35-40 .
29. Heneman, K., & Zidenberg-Cherr, S. (2008). Nutrition and health info sheet: Phytochemicals.
30. Hraš, A. R., Hadolin, M., Knez, Ž., & Bauman, D. (2000). Comparison of antioxidative and synergistic effects of rosemary extract with α-tocopherol, ascorbyl palmitate and citric acid in sunflower oil. *Food chemistry*, 71(2), 229-233. https://doi.org/10.3733/ucanr.8313
31. Iqbal, S., & Bhanger, M. (2006). Effect of season and production location on antioxidant activity of *Moringa oleifera* leaves grown in Pakistan. *Journal of food composition and analysis*, 19(6-7), 544-551. https://doi.org/10.1016/j.jfca.2005.05.001
32. Iran, I. o. S. a. I. R. o. (2011). Animal and vegetable fats and oils - Determination of refractive index. ISIRI no 5108, 1st. Revision.
33. Iran, I. o. S. a. I. R. o. (2018). Animal and vegetable fats and oils - Determination of peroxide value - Iodometric (visual) endpoint determination. INSO no 4179, 2nd Revision (Identical with ISO 3960:2017).
34. Ishii, T., Mori, T., Tanaka, T., Mizuno, D., Yamaji, R., Kumazawa, S., Akagawa, M. (2008). Covalent modification of proteins by green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate through autoxidation. *Free radical biology and medicine*, 45(10), 1384-1394. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.023
35. Karageorgou, I., Grigorakis, S., Lalas, S., & Makris, D. P. (2017). Enhanced extraction of antioxidant polyphenols from *Moringa oleifera* Lam. leaves using a biomolecule-based low-transition temperature mixture. *European food research and technology*, 243(10), 1839-1848. https://doi.org/10.1007/s00217-017-2887-1
36. Kepekçi, R. A., & Saygideger, S. D. (2012). Enhancement of phenolic compound production in *Spirulina platensis* by two-step batch mode cultivation. *Journal of applied Phycology*, 24(4), 897-905. https://doi.org/10.1007/s10811-011-9710-3
37. Keramat M, Golmakani M T, Lari M A, Alavi N, Norozi M, Shekar Foroosh S. (2014). Investigation the oxidative stability of virgin olive oil by using rosemary (*Rosmarinus officinalis*) essential oil. FSCT. 0; 13 (60):157-172[In Persian].
38. Keramat, M., & Golmakani, M. (2016). Effect of Thymus vulgaris and Bunium persicum essential oils on the oxidative stability of virgin olive oil. *Grasas y aceites*, 67(4), 162. https://doi.org/10.3989/gya.0337161
39. Khalighi-Sigaroodi, F., Ahvazi, M., Hadjiakhoondi, A., Taghizadeh, M., Yazdani, D., Khalighi-Sigaroodi, S., & Bidel, S. (2012). Cytotoxicity and antioxidant activity of 23 plant species of Leguminosae family. *Iranian journal of pharmaceutical research*: IJPR, 11(1), 295.

40. Kuda, T., Taniguchi, E., Nishizawa, M., & Araki, Y. (2002). Fate of water-soluble polysaccharides in dried Chorda filum a brown alga during water washing. *Journal of food composition and analysis*, 15(1), 3-9. https://doi.org/10.1006/jfca.2001.1037
41. Lalas, S., & Tsaknis, J. (2002). Extraction and identification of natural antioxidant from the seeds of the *Moringa oleifera* tree variety of Malawi. *Journal of the American oil chemists' society*, 79(7), 677-683. https://doi.org/10.1007/s11746-002-0542-2
42. Li, H., Wang, X., Li, Y., Li, P., & Wang, H. (2009). Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. *Food chemistry*, 112(2), 454-460. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.111
43. Lin, M., Zhang, J., & Chen, X. (2018). Bioactive flavonoids in *Moringa oleifera* and their health-promoting properties. *Journal of functional foods*, 47, 469-479. https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.06.011
44. Makita, C., Chimuka, L., Steenkamp, P., Cukrowska, E., & Madala, E. (2016). Comparative analyses of flavonoid content in *Moringa oleifera* and *Moringa ovalifolia* with the aid of UHPLC-qTOF-MS fingerprinting. *South African journal of botany*, 105, 116-122. https://doi.org/10.1016/j.sajb.2015.12.007
45. Martinez-Tome, M., Jimenez, A. M., Ruggieri, S., Frega, N., Strabbioli, R., & Murcia, M. A. (2001). Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of food protection*, 64(9), 1412-1419. https://doi.org/10.4315/0362-028X-64.9.1412
46. Mendiola, J., Jaime, L., Santoyo, S., Reglero, G., Cifuentes, A., Ibañez, E., & Señoráns, F. (2007). Screening of functional compounds in supercritical fluid extracts from *Spirulina platensis*. *Food chemistry*, 102(4), 1357-1367. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.06.068
47. M'hiri, N., Ioannou, I., Boudhrioua, N. M., & Ghoul, M. (2015). Effect of different operating conditions on the extraction of phenolic compounds in orange peel. *Food and bioproducts processing*, 96, 161-170. https://doi.org/10.1016/j.fbp.2015.07.010
48. Morales, M. T., & Przybylski, R. (2013). Olive oil oxidation. In Handbook of olive oil (pp. 479-522): Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7777-8_13
49. Morsy, M. K., Morsy, O. M., Elbarbary, H. A., & Saad, M. A. (2019). Enhancing of oxidative stability and quality attributes of olive oil using spirulina (*Arthrospira platensis*) nanoparticles. *LWT*, 101, 444-455. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.11.056
50. Nichols, D. S., & Sanderson, K. (2003). The nomenclature, structure, and properties of food lipids. *Chemical and functional properties of food lipids*, 29-59.
51. O'brien, R. D. (2008). Fats and oils: formulating and processing for applications: CRC press. https://doi.org/10.1201/9781420061673
52. Onsare, J. G., & Arora, D. S. (2015). Antibiofilm potential of flavonoids extracted from *Moringa oleifera* seed coat against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. *Journal of applied microbiology*, 118(2), 313-325. https://doi.org/10.1111/jam.12701
53. Oyeniran, O. H., Ademiluyi, A. O., & Oboh, G. (2020). Comparative study of the phenolic profile, antioxidant properties, and inhibitory effects of *Moringa* (*Moringa oleifera* Lam.) and Almond (*Terminalia catappa* Linn.) leaves on acetylcholinesterase and monoamine oxidase activities in the head region of Fruitfly (Drosophila melanogaster Meigen) in vitro. *Journal of Food Biochemistry*, e13401.
54. Ozdemir, G., Ulku Karabay, N., Dalay, M. C., & Pazarbasi, B. (2004). Antibacterial activity of volatile component and various extracts of *Spirulina platensis*. Phytotherapy Research: An International Journal devoted to pharmacological and toxicological evaluation of natural product derivatives, 18(9), 754-757. https://doi.org/10.1002/ptr.1541
55. Pagnussatt, F. A., Del Ponte, E. M., Garda-Buffon, J., & Badiale-Furlong, E. (2014). Inhibition of Fusarium graminearum growth and mycotoxin production by phenolic extract from *Spirulina* sp. *Pesticide biochemistry and physiology*, 108, 21- 26. https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2013.11.002
56. Petersen, M., & Simmonds, M. S. (2003). Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62(2), 121-125. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(02)00513-7
57. PhD, O. I. A. (1999). Free radicals, antioxidants and international nutrition. *Asia Pacific journal of clinical nutrition*, 8(1), 53-63. https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.1999.00036.x
58. Piroddi, M., Albini, A., Fabiani, R., Giovannelli, L., Luceri, C., Natella, F., Servili, M. (2017). Nutrigenomics of extra-virgin olive oil: A review. *Biofactors*, 43(1), 17-41. https://doi.org/10.1002/biof.1318
59. Pradeep, K., Park, S. H., & Ko, K. C. (2008). Hesperidin a flavanoglycone protects against γ-irradiation induced hepatocellular damage and oxidative stress in Sprague–Dawley rats. *European journal of pharmacology*, 587(1-3), 273-280. https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.052

60. Qiao ,S., Li, W., Tsubouchi, R., Haneda, M., Murakami, K., Takeuchi, F., Yoshino, M. (2005). Rosmarinic acid inhibits the formation of reactive oxygen and nitrogen species in RAW264. 7 macrophages. *Free radical research*, 39(9), 995-1003. https://doi.org/10.1080/10715760500231836
61. Rallo, L., Díez ,C. M., Morales-Sillero, A., Miho, H., Priego-Capote, F., & Rallo, P. (2018). Quality of olives: A focus on agricultural preharvest factors. *Scientia Horticulturae*, 233, 491-509. https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.12.034
62. Rasika, J. (2013). Antimicrobial Activity of *Moringa oleifera* and Its Synergism with Cleome Viscosa. *Int. J. Life Sciences*, 1(3), 182-189.
63. Rodriguez-Amaya, D. B. (2003). Food carotenoids: Analysis, composition and alterations during storage and processing of foods. *In Forum of nutrition* (Vol. 56, p. 35).
64. Sahu, R. K., Kar, M., & Routray, R. (2013). DPPH free radical scavenging activity of some leafy vegetables used by tribals of Odisha, *India. J. Med. Plants*, 1(4), 21-27.
65. Samad, L. H., Azizi, M., & Barzegar, M. (2007). Antioxidative effect of pomegranate seed phenolic componends on soybean oil. 193-200.
66. Samanta, S. K., Kandimalla, R., Gogoi, B., Dutta, K. N., Choudhury, P., Deb, P. K., & Talukdar, N. C. (2018). Phytochemical portfolio and anticancer activity of Murraya koenigii and its primary active component, mahanine. *Pharmacological research*, 129, 227-236. https://doi.org/10.1016/j.phrs.2017.11.024
67. Seghiri, R., Kharbach, M., & Essamri, A. (2019). Functional composition, nutritional properties, and biological activities of Moroccan *Spirulina microalga*. *Journal of food quality*, 2019 .
68. Senanayake, S. N. (2013). Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications–A review. *Journal of functional foods*, 5(4), 1529-1541. https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.08.011
69. Servili, M., Sordini, B., Esposto, S., Urbani, S., Veneziani, G., Di Maio, I., Taticchi, A. (2014). Biological activities of phenolic compounds of extra virgin olive oil. *Antioxidants*, 3(1), 1-23. https://doi.org/10.3390/antiox3010001
70. Siddhuraju, P., & Becker, K. (2003). Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(8), 2144-2155. https://doi.org/10.1021/jf020444+
71. Silva, L., Pinto, J., Carrola, J., & Paiva-Martins, F. (2010). Oxidative stability of olive oil after food processing and comparison with other vegetable oils. *Food chemistry*, 121(4), 1177-1187. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.02.001
72. Singh, G., Maurya, S., De Lampasona, M., & Catalan, C. (2006). Chemical constituents, antifungal and antioxidative potential of *Foeniculum vulgare* volatile oil and its acetone extract. *Food control*, 17(9), 745-752. https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2005.03.010
73. Sonam, K. S., & Guleria, S. (2017). Synergistic antioxidant activity of natural products. *Annals of pharmacology and pharmaceutics*, 2(16), 1-6.
74. Sreelatha, S., & Padma, P. R. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of *Moringa oleifera* leaves in two stages of maturity. *Plant foods for human nutrition*, 64(4), 303. https://doi.org/10.1007/s11130-009-0141-0
75. Sultana, B., & Anwar, F. (2008). Flavonols (kaempeferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food chemistry*, 108(3), 879-884. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.11.053
76. Szabo, M. R., Idiţoiu, C., Chambre, D., & Lupea, A. X. (2007). Improved DPPH determination for antioxidant activity spectrophotometric assay. *Chemical papers*, 61(3), 214-216. https://doi.org/10.2478/s11696-007-0022-7
77. Tabee, E., Azadmard-Damirchi, S., Jägerstad, M., & Dutta ,P. C. (2008). Effects of α-tocopherol on oxidative stability and phytosterol oxidation during heating in some regular and high-oleic vegetable oils. *Journal of the American oil chemists' society*, 85(9), 857-867. https://doi.org/10.1007/s11746-008-1274-2
78. Tirkey, N., Pilkhwal, S., Kuhad, A., & Chopra, K. (2005). Hesperidin, a citrus bioflavonoid, decreases the oxidative stress produced by carbon tetrachloride in rat liver and kidney. *BMC pharmacology*, 5(1), 2. https://doi.org/10.1186/1471-2210-5-2
79. Verma, A. R., Vijayakumar, M., Mathela, C. S., & Rao, C. V. (2009). In vitro and in vivo antioxidant properties of different fractions of *Moringa oleifera* leaves. *Food and chemical toxicology*, 47(9), 2196-2201. https://doi.org/10.1016/j.fct.2009.06.005
80. Walton, N. J., Mayer, M. J., & Narbad, A. (2003). Vanillin. *Phytochemistry*, 63(5), 505-515. https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00149-3
81. Wang, L., Pan, B., Sheng, J., Xu, J., Hu, Q. (2007). Antioxidant activity of *Spirulina platensis* extracts by supercritical carbon dioxide extraction. *Food chemistry*, 105(1), 36-41. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.03.054
82. Wang, S., Yang, C., Tu, H., Zhou, J., Liu, X., Cheng, Y., Xu, J. (2017). Characterization and metabolic diversity of flavonoids in citrus species. *Scientific reports*, 7(1), 1-10. https://doi.org/10.1038/s41598-017-10970-2

83. Xiang, N., Guo, X., Liu, F., Li, Q., Hu, J., Brennan, C. S. (2017). Effect of light-and dark-germination on the phenolic biosynthesis, phytochemical profiles, and antioxidant activities in sweet corn (*Zea mays* L.) sprouts. *International journal of molecular sciences*, 18(6), 1246. https://doi.org/10.3390/ijms18061246
84. Zhang, W. W., Duan, X. J., Huang, H. L., Zhang, Y., Wang, B. G. (2007). Evaluation of 28 marine algae from the Qingdao coast for antioxidative capacity and determination of antioxidant efficiency and total phenolic content of fractions and subfractions derived from *Symphyocladia latiuscula* (*Rhodomelaceae*). *Journal of applied phycology*, 19(2), 97-108. https://doi.org/10.1007/s10811-006-9115-x